

Methodik der Isolierung von Langerhansschen Inseln
mit Hilfe enzymatischer Spaltung und Filtertrennung
und Transplantation isolierter Inseln über die
Pfortader in die Leber pankreatektomierter Hunde

Der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
als Habilitationsschrift für das Fach Chirurgie vorgelegt

von

Wolfgang van der Horst

Aus der Chirurgischen Klinik A der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof.Dr.med. K. Kremer)

Methodik der Isolierung von Langerhansschen Inseln
mit Hilfe enzymatischer Spaltung und Filtertrennung
und Transplantation isolierter Inseln über die
Pfortader in die Leber pankreatektomierter Hunde

Der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
als Habilitationsschrift für das Fach Chirurgie vorgelegt

von

Wolfgang van der Horst

Düsseldorf, im Februar 1982

Inhaltsangabe

	Seite
I. Einleitung	1
II. Eigene Zielsetzung	5
III. Zur Anatomie und Physiologie	7
IV. Stand der Isolierung und Transplantation	10
1. Isolierung	10
2. Experimentelle Transplantation	15
3. Klinische Inseltransplantation	18
V. Experimentelle Methodik	20
1. Diabetesmodell	20
a. Vorgehen bei der Duodeno-pankreatektomie	20
b. Vorgehen bei der Pankreatektomie nach Markowitz	22
c. Postoperative Versorgung	23
2. Methodik der Inselisolierung	24
a. Distension und Homogenisierung	24
b. Digestion	25
c. Filtrierung	26
3. Transplantation	28
4. Labormethoden	29
VI. Ergebnisse	31
1. Kontrolltiere	31
a. postoperative Komplikationen	31
b. Vergleich der Diabetesmodelle	32
2. Effektivität der Isolierung	33
3. Pfortaderdruck und Leberwertenach Transplantation	34
4. Autotransplantation	37
a. Laborparameter	37
b. Leberhistologie	41
5. Allotransplantation	43
a. Laborparameter	43
b. Leberhistologie	45

VII.	Diskussion	Seite 46
	1. Diabetesmodell	47
	2. Effektivität der Isolierung	49
	3. Transplantationsort und Pfortaderdruck	52
	4. Funktion nach Autotransplantation	54
	5. Funktion nach Alлотransplantation	57
VIII.	Schlußfolgerungen	59
IX.	Zusammenfassung	61
X.	Literaturverzeichnis	63

I. Einleitung

Bevor 1931 die exogene Insulintherapie eingeführt wurde, betrug die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnosestellung eines Diabetes mellitus etwa 2 Jahre (62). Heute wird die Lebenserwartung der Diabetiker im wesentlichen durch die diabetischen Spätkomplikationen bestimmt. Etwa 76,6 % aller Diabetiker sterben infolge der typischen Gefäßveränderungen (62).

Auch bei weitgehend exakter Einstellung des Diabetes sind die Spätschäden oft nicht vermeidbar (127). Dabei ist noch nicht vollkommen geklärt, ob außer Insulin weitere Faktoren wie Glukagon oder Cortison für diese Entwicklung verantwortlich sind, oder ob die trotz weitgehender Kontrolle schwankenden Glukosespiegel diese Veränderungen hervorrufen.

Als eine ideale Behandlung kommt die Transplantation des Inselorganes in Betracht. Nach tierexperimentellen Befunden konnte nachgewiesen werden, daß durch eine erfolgreiche Inseltransplantation mit erreichter Normoglykämie Spätschäden vermeidbar (125) oder sogar rückbildungsfähig sind (18, 69, 111).

Bereits um die Jahrhundertwende wurde versucht, durch einen biologischen Ersatz der erkrankten Bauchspeicheldrüse einen Diabetes mellitus zu heilen (92). Die eigentliche Geschichte der menschlichen Pankreastransplantation beginnt jedoch im Dezember 1966 mit der ersten Organtransplantation durch Kelly und Lillehei (36).

Ein weiteres ideales Behandlungsverfahren ist denkbar durch die Entwicklung des sogenannten 'künstlichen Pankreas'. Hierbei wird entsprechend dem aktuellen Blutzuckerspiegel kontinuierlich Insulin substituiert.

Diese künstliche B-Zelle erfordert eine aufwendige computergesteuerte Apparatur und befindet sich als implantierbares System noch im Experimentierstadium (91). Besonders problematisch ist die Abwehrreaktion des Organismus gegen die enzymbeschichtete Membran zur Glukoseanalyse, die nach einigen Tagen durch Ablagerung von Fibrin und Zellen funktionsunfähig wird.

Die Transplantation betreffend galt bis vor einigen Jahren das Hauptinteresse der kompletten Pankreas- transplantation mit Duodenalsegment oder der Transplantation eines distalen Pankreasanteiles (72). Nach tierexperimentellen Erfolgen wurden bis 1976 insgesamt 51 Pankreastransplantationen beim Menschen durchgeführt (34, 52). Obwohl eine endokrine Funktion nachweisbar war, wurden die Erwartungen keinesfalls erfüllt, da die Verläufe jeweils kompliziert waren durch Anastomoseninsuffizienzen, Gangrän des transplantierten Darmsegmentes mit Perforation, Fistelbildungen, Blutungen, Abstoßungsreaktionen und Abszeßbildungen (55). 2 Patienten überlebten mehrere Jahre mit funktionstüchtigem Transplantat, wobei hier der Pankreasgang mit dem Ureter des Empfängers vereinigt wurde (25). Wegen der erheblichen Komplikationen bei der Pankreasorgantransplantation gewann die Transplantation isolierter Pankreasinseln zunehmend an Bedeutung.

Über die Technik der Inselisolierung und die Transplantation der Inseln in verschiedene Organe liegen zahlreiche Untersuchungen vor allem bei Nagetieren vor. Erste Transplantationen in der Humanmedizin ließen aber den erwarteten Effekt vermissen, der Insulinbedarf konnte lediglich vorübergehend gesenkt werden (52). Besondere Komplikationen waren mit der Form der intra- portalen Transplantation in die Leber nicht verbunden, der Empfänger wurde hierdurch also nicht geschädigt.

Die Hauptproblematik liegt noch in der ungenügenden Ausbeute an zu transplantierenden Inseln und in der hohen immunologischen Empfindlichkeit isolierter Inselzellen (10).

Ein weiteres Interesse der Inseltransplantation gilt der Anwendung als Autotransplantat bei erforderlicher Duodeno-pankreatektomie oder subtotaler Pankreatektomie wegen chronischer Pankreatitis. Obwohl für einige Fälle dieser Erkrankung heute ein Behandlungsversuch mit Gangverödung durch Injektion eines Okklusionsgels in den Pankreasgang gerechtfertigt ist, ergibt sich bei bestehenden cystischen Gangerweiterungen und Gangstenosierungen die Notwendigkeit zur Resektion (106). Wenn es gelingt, noch funktionstüchtige Inseln vom erkrankten exokrinen Organ zu trennen und durch Transplantation in die Leber oder die Milz zu retten, könnte diesem Patientenkreis ein Diabetes erspart bleiben, oder zumindest der Insulinbedarf verringert werden. Hierüber wurden in letzter Zeit positive Erfahrungen mitgeteilt (15, 113). Nach dem von Lorenz (60) aktualisierten Transplantationsregister erfolgten bis Dezember 1980 59 autologe Transplantationen, wobei 28 Patienten frei von Insulinsubstitution waren. Hierunter befinden sich jedoch auch die Patienten mit subtotaler Pankreatektomie.

Insgesamt hat sich die Pankreasorgantransplantation als zu gefährvoll erwiesen, und die allogene Transplantation isolierter Inseln erscheint nach den bisher verwendeten Methoden noch als zu wenig effektiv (52). Daher wird neben der Inseltransplantation die Organtransplantation unter Verwendung eines Pankreassegmentes nach Pankreasgangokklusion verfolgt. Durch die Gangokklusion ist die Problematik der Ableitung exokriner Enzyme umgangen (49). Nach tierexperimentellen Studien konnte

Dubernard (16) bei 3 Patienten bis 8 Monate nach Transplantation bei Immunsuppression ausreichende Funktion nachweisen. Auch bei weiteren Transplantationen kam es jeweils nach einigen Monaten zu Funktionsausfall, wobei unklar blieb, ob die Fibrosierung des Transplantates infolge der Gangokklusion oder eine Abwehrreaktion hierfür verantwortlich war.

Einen Weg der Organtransplantation ohne Gangokklusion und ohne Ganganastomosierung versuchte Sutherland (114) durch Ableitung der Enzyme in die freie Bauchhöhle. Eine Funktion des Transplantates war mehrere Monate nachweisbar, jedoch traten bei 2 Patienten schwere septische Komplikationen auf. 1981 berichtet Sutherland (116) über 20 Patienten, die nach einer Nierentransplantation wegen terminaler diabetischer Nephropathie ein Pankreassegment teils mit freier Ableitung in die Bauchhöhle, teils mit Gangokklusion erhielten. Bei 3 Patienten traten letale Komplikationen auf, und 11 mal kam es zu einem Funktionsverlust innerhalb von 3 Monaten. 2 Patienten tragen ein funktionstüchtiges Transplantat nach über 31 bzw. 15 Monaten.

In der Transplantationschirurgie des Inselorganes stellen die Pankreassegmenttransplantation und die Transplantation isolierter Inseln nach dem derzeitigen Forschungsstand alternative Verfahren dar. Beide Transplantationsformen sind aus den genannten Gründen problematisch. Die Inseltransplantation könnte zusätzlich weitere Bedeutung als Autotransplantat erlangen.

II. Eigene Zielsetzung

Die bis jetzt vorliegenden experimentellen und klinischen Erfahrungsberichte zur Inseltransplantation stellen als ein zentrales Problem die Technik der Isolierung in den Vordergrund. Eine ausreichende Menge an Inseln erhält man mit den beschriebenen Methoden nur dann, wenn man eine erhebliche Verunreinigung mit exokrinem Gewebe akzeptiert. Wegen der Menge des dann zu transplantierenden Gewebes läßt sich eine intraportale Applikation nicht ohne Gefährdung durchführen.

Davon ausgehend, daß sich entsprechend zahlreicher Untersuchungen die Leber für die Transplantation besonders eignet, haben wir das Problem der Inselisolierung speziell in Angriff genommen. In Vorversuchen wurde zunächst versucht, die Isolierung mit der sogenannten Fikoll-Gradiententechnik nachzuvollziehen. Neben der Aufwendigkeit erwies sich das Verfahren mit einer Ausbeute von 2 - 6 % der vorhandenen Inseln als wenig effektiv. Mit Hilfe eines Filtersystems haben wir dann versucht, die Ausbeute an isolierten Inseln zu verbessern.

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie ist neben der grundsätzlichen Einarbeitung in die Problematik mit Erstellung eines geeigneten Diabetesmodells auf die Verbesserung der Isolationstechnik gerichtet. Dazu sind folgende Schritte geplant:

1. Entwicklung eines geeigneten Verfahrens zur Inselisolierung, welches auch im Operationssaal einsatzfähig werden kann
2. Nachweis der Unschädlichkeit für den Empfänger bei der Transplantation via Pfortader in die Leber pankreatektomierter Hunde

3. Endokrine Funktionskontrolle nach Inselauto-
transplantation beim pankreatektomierten Hund
4. Endokrine Funktionskontrolle nach Inselallo-
transplantation beim pankreatektomierten Hund
ohne Immunsuppression

III. Zur Anatomie und Physiologie

Exokrines und endokrines Gewebe des Pankreas entwickeln sich aus dem entodermalen Epithel des Duodenums. Etwa im 3. Keimlingsmonat lösen sich beim Menschen Epithelsprossen als Inselzapfen ab. Die Langerhansschen Inseln bilden keinen Hohlraum und haben besonders enge Beziehungen zu den Blutgefäßen. Die Fähigkeit des Drüsengewebes, Inseln zu bilden, bleibt wahrscheinlich auch noch in späteren Lebensjahren erhalten (7).

Die Gesamtzahl der Inseln schwankt bei gesunden Erwachsenen erheblich. Nach ausführlichen Untersuchungen wurden in 53 bis 87 g schweren Bauchspeicheldrüsen Erwachsener zwischen 208 000 und 1 760 000 Inseln gezählt (88). Bei Kindern ist die Zahl geringer, entsprechend der noch vorhandenen Bildungsfähigkeit. Der Durchmesser der Inseln bewegt sich normalerweise zwischen 75 und 225 μm , jedoch wurden maximale Durchmesser um 500 μm beobachtet.

Beim Erwachsenen machen die Inseln 0,9 bis 3,6 % des Pankreasgewichtes aus. Bei Neugeborenen liegt der Inselanteil noch bei 19 bis 33 %. Das normale Pankreasgewicht beträgt bei der Geburt 2,5 g, im 3. Lebensjahr 20 g und bei Erwachsenen 70 bis 90 g.

Beim Hund besteht der milzwärtige Anteil des Pankreas zu 0,6 bis 2,6 % aus Inselgewebe, während im duodenalen Anteil nur 0,14 bis 0,8 % Inseln enthalten sind. Im Milzlappen des Hundes sind die Inseln nicht nur zahlreicher, sondern auch größer. Form und Größe entsprechen etwa den Verhältnissen beim Menschen (Abb. 1). Viele Inseln sind beim Hund jedoch ganz unregelmäßig

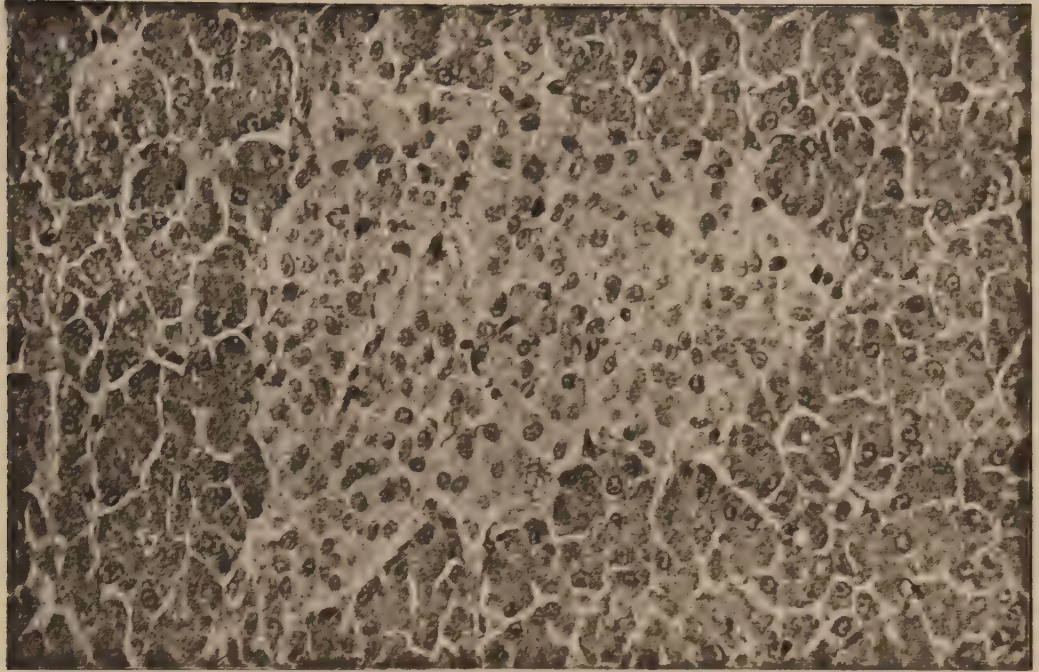


Abb. 1 Normale Insel des Hundes im Gewebeverband.
PAS - Färbung, 250-fach

begrenzt und bilden sternförmige Umrisse mit kurzen Strahlen. Auch die Zusammensetzung der Zellen entspricht der des Menschen: 75 % B-Zellen, 20 % A-Zellen und 5 % D-Zellen (20).

Die Blutversorgung des Pankreas erfolgt einerseits über die A. pankreaticoduodenalis sup. und inf. und andererseits über Äste der A. lienalis. Beim Hund nimmt die A. pankreaticoduodenalis auf eine lange Strecke ihren Verlauf durch den Pankreaskopf und den sogenannten Proc. uncinatus des Pankreas (Abb. 2).

Betreffend nervaler Einflüsse konnte beim Hund nachgewiesen werden, daß die Insulinsekretion durch Aktivierung sympathischer Nerven gebremst und durch Stimulierung parasympathischer Nerven erhöht werden kann (93).

Der Diabetes mellitus kann als eine erbliche chronische Stoffwechselerkrankung definiert werden, die auf einem absoluten oder relativen Mangel an Insulin beruht. Bei absolutem Insulinmangel lassen sich die biochemischen Befunde unmittelbar erklären: Hyperglykämie durch mangelhafte periphere Glukoseverwertung und gesteigerte Glukoseneubildung, Anstieg freier Fettsäuren im Serum durch die fehlende Lipolysehemmung, durch Überangebot freier Fettsäuren und verminderte Verwertung von Acetyl-Coenzym A vermehrte Bildung von Ketonkörpern, durch die sauren Endprodukte des Fettstoffwechsels kommt es zur Azidose.

Beim jugendlichen Diabetes (Typ-I Diabetes), der bei etwa 20 % aller Diabetiker vorliegt, handelt es sich um absoluten Insulinmangel. Der Altersdiabetes ist dagegen charakterisiert durch ein vermindertes und verzögertes Ansprechen der B-Zellen auf Sekretionsreize und ein vermindertes Ansprechen der Erfolgsorgane auf

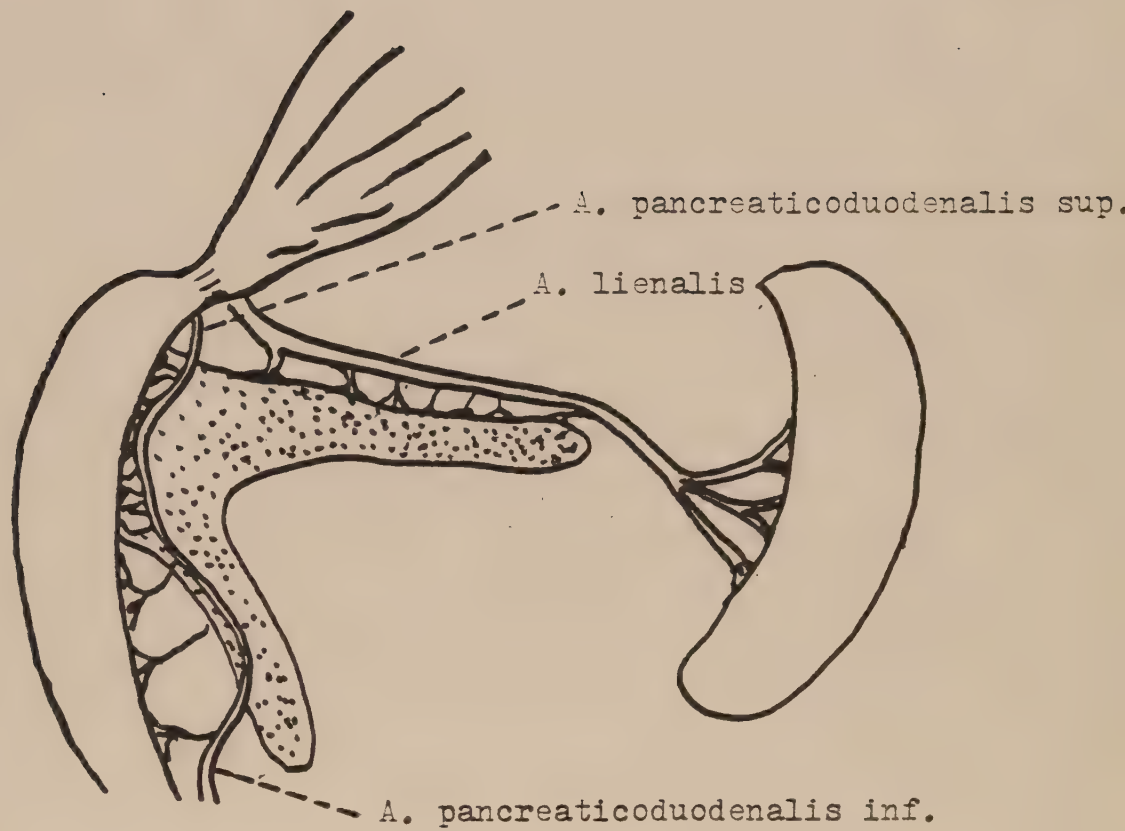


Abb. 2 Schematische Darstellung der Gefäßversorgung
des Hundepankreas

das Insulin. In den letzten Jahren konnte nachgewiesen werden, daß hier die Vermittlung durch periphere Insulinrezeptoren ausbleibt, und daß bei diesen Diabetesformen die Zahl der Insulinrezeptoren in den Erfolgsorganen vermindert ist. Entsprechend liegen die Insulinwerte bei fettsüchtigen Diabetikern im Normbereich oder häufig sogar oberhalb der Norm.

Infolge des gestörten Kohlehydrat- und Fettstoffwechsels kommt es nach unterschiedlich langem Krankheitsverlauf zu typischen Gefäßveränderungen. Die entstehende Mikroangiopathie mit Verdickungen der Basalmembranen manifestiert sich in erster Linie an Nieren, Augen und an den unteren Extremitäten. Bei Patienten mit diabetischer Nephropathie und terminalem Nierenversagen bietet sich nach Nierentransplantation mit erforderlicher Immunsuppression eventuell die Möglichkeit an, durch Transplantation des endokrinen Pankreas die transplantierte Niere vor gleichartigen Veränderungen zu bewahren.

IV. Stand der Inselisolierung und Transplantation

1. Inselisolierung

Das erste Verfahren zur Isolierung von Inseln wurde 1914 von Bensley beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine rein mikroskopische Technik zur Auspräparation einzelner gefärbter Inseln. Dieses 'pick-up'-Verfahren wird bis heute in abgewandelter Form verwendet und ist zu Funktionskontrollen in vitro geeignet (19).

Seit Moskalewski (78) 1965 erstmals die Technik enzymatischer Isolierung von Pankreasinseln beschrieb, sind viele Studien zur Inselzellfunktion und zur Inseltransplantation gefolgt. Die Isolierung der Inseln von Nagetieren und die Transplantationstechnik läßt sich jedoch nicht ohne weiteres auf höhere Säugetiere übertragen. So ist bis heute die Isolierung einer ausreichenden Zahl von intakten Inseln aus dem Pankreas höherer Säugetiere und aus dem menschlichen Pankreas ein Problem geblieben (30, 61, 73, 104).

Für den Transplantationserfolg wird beim Menschen die Isolierung von 50 000 bis 175 000 Inseln für erforderlich gehalten (18, 27). Sutherland (112) erachtet bei intraportaler Applikation 6 % der normalerweise im Pankreas vorhandenen Inseln zu einem Transplantationserfolg für erforderlich. Jedoch kann die Zahl der histologisch nachgewiesenen Inseln als Kriterium nicht allein entscheidend sein, da je nach Isolationsprozedur ein mehr oder minder großer Anteil der Inseln geschädigt werden kann (2, 19).

Die grundlegende Arbeit von Moskalewski befaßt sich mit der Separierung von Inseln aus dem Pankreas des Meerschweinchens mit Hilfe enzymatischer Spaltung.

Als Enzymkomplex verwendete Moskalewski Kollagenase, inkubierte das zerkleinerte Gewebe bei 37 °C und gewann die Inseln durch Sedimentierung mit einem hohen Anteil exokriner Zellen.

Bei der Kollagenase handelt es sich um einen Enzymkomplex, der von Bakterien gebildet wird. Es gibt keine genaue Kontrolle über die verschiedenen Enzymanteile und Aktivitäten in jeder einzelnen Serie. Damit kann auch keine standardisierte Menge oder Andauungszeit für die Enzymlösung gegeben werden. Bei der Inkubation bis zu 15 Minuten werden feinstrukturell keine Veränderungen der A- und B- Zellen gefunden (29). Durch die Kollagenasedigestion soll etwa 90 % der exokrinen Enzymaktivität zerstört werden. Dagegen erfolgt nach Traverso (118) eine Aktivierung der proteolytischen Aktivität der Enzyme durch die Kollagenase. Durch seine Untersuchungen konnte er nachweisen, daß die Verwendung einer hochgereinigten Kollagenase zur Gewebetrennung mehrere Stunden Inkubationszeit erfordert. Traverso weist auf die Bedeutung der Pankreasenzyme und deren Aktivierung durch verunreinigende Begleitenzyme der üblichen Kollagenasekomplexe hin. Nach Hahn (29) enthalten die handelsüblichen Kollagenaseansätze bis zu 10 % proteolytische Aktivität als Verunreinigung.

Lacy und Kostianowsky (47) konnten die Ausbeute an isolierten Inseln dadurch verbessern, daß sie durch Injektion einer Salzlösung in den Pankreasgang eine mechanische Zerreißung des Organes und damit einen verbesserten Enzymkontakt erreichten.

Der letzte Schritt zur Isolierung vom exokrinen Anteil war lange Zeit das 'handpicking' unter dem Mikroskop. Die Identifizierung von Inseln der Ratte ist aufgrund der rundlichen Struktur einfach. Jedoch ist beim

Hund eine selektive Anfärbung, z.B. mit Neutralrot oder Janusgrün, zur Erkennung der Inseln erforderlich. Für funktionelle Studien in vitro ist diese Isolationsmethode befriedigend. Jedoch um die Masse der Inseln zu transplantieren, eignet sich dieses zeitaufwendige Verfahren nicht.

Von Lacy (47) wurde auch erstmals die Trennung der Inseln vom exokrinen Anteil durch Gradiententechnik beschrieben. Lacy verwendete eine Saccharose mit abgestufter Konzentration, da sich die Inseln bei der Zentrifugation vermehrt in Schichten definierter Dichte sammeln. Jedoch konnte bei der in vitro Prüfung keine Insulinsekretion mehr gemessen werden. Auch bei Verwendung von Fikoll-Lösung, einem hochmolekularen Polymer der Saccharose, zeigte sich die Funktionsstörung infolge der hohen Osmolarität (56). Erst nach Dialyse der Fikoll-Lösung mit Befreiung von Natrium und Kalium und von niedermolekularen Bestandteilen des Fikolls wird diese Methode brauchbar (3, 32, 101).

Die Kollagenaseandauung und Fikoll-Schichtentrennung war viele Jahre und ist teilweise auch heute noch eine Standardmethode der Inselisolierung. Es zeigte sich jedoch, daß diese bei Nagetieren geeignete Methode für die Isolierung aus dem mehr fibrösen Pankreas höherer Säugetiere und des Menschen wegen zu geringer Ausbeute an Inseln weniger geeignet ist. Die Effektivität der Trennung wird mit 5 - 10 % angegeben (64, 112). Außerdem muß hinsichtlich der Transplantation die Toxizität von Fikoll beachtet werden (50).

Eine kombinierte enzymatische Methode mit Filtrierung und Schichtentrennung wurde 1975 von Scharp angegeben (102).

Scharp verwendete Filter mit 260 μ m Porendurchmesser, die eine Passage isolierter Inseln und isolierter exokriner Zellen erlauben. Die Abfiltration erfolgt während der Digestion, um bereits isolierte Inseln vor weiterer Digestion zu schützen. Die Verunreinigung mit exokrinen Zellen erfordert dabei als zusätzlichen Schritt die Fikoll-Schichtentrennung. Shibata (107) verwendete ebenfalls dieses Filterverfahren. Jedoch fand Scharp bei der Aufarbeitung menschlicher Pankreata mit dieser Methode eine ungenügende Inselausbeute.

Eine weitere Verbesserung erreichte Scharp (103, 104) durch Distension des Organes über das venöse System, wodurch bereits eine feine intralobuläre Zerreißung auftrat. Nach Digestion bis zur Aufspaltung in eine Suspension einzelner Zellen und Anreicherung der endokrinen Zellen mit Hilfe der Fikoll-Gradiententechnik erhielt Scharp sogenannte Pseudoinseln in Form aneinandergelagerter Inselzellen.

Als weitere Vorbereitung zur Transplantation dienten zahlreiche Versuche der Kultivierung und Konservierung von Pankreasinseln (64, 84, 95). Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit zur Ansammlung einer ausreichenden Menge und zeitlich die Möglichkeit zur Gewebetypisierung für die Allotransplantation. Bei Verwendung von fetalem Gewebe kann durch Kultivierung eine Funktionsaufnahme und eventuell eine Zellvermehrung erreicht werden. Auch über günstige Veränderung der Antigenität durch Kultivierung von Inseln wird berichtet (108, 121).

Durch Kurzkultivierung über 24 Stunden mit Pilocarpin, Kobalddchlorid und Aprotinin nimmt der Insulin-Amylasequotient rasch zu (64). Die Inselkultivierung in physiologischem Medium mit 20 % Kälberserum und Penicillin bei 37 °C und 95 % O₂ ergibt bis zum 7. Tag normale

Sekretion wie bei frisch isolierten Zellen und Funktionsaufnahme 1 Woche nach Transplantation über die V. portae in die Leber (84). Nach Kryopreservation von isolierten Inseln der Ratte zeigt sich eine normale in vitro und in vivo Funktion (38).

Einen anderen Weg mit Transplantation von grob getrenntem Gewebe beschritt Mirkovitch (73). Nach Inkubation des zerkleinerten Pankreas transplantierte er den gesamten gewaschenen Gewebepbrei. Es zeigten sich jedoch multiple Portalvenenobstruktionen mit erhöhtem Druck im Pfortadersystem. Kretschmer (42) verzichtete ebenfalls auf eine weitere Isolationsprozedur und transplantierte das grob getrennte Gewebe in die Milz pankreatektomierter Hunde. Sutherland und Najarian (115) verfügen über Erfahrungen mit Verwendung grob getrennter Pankreasfragmente in der Humanmedizin.

Bei kalter Konservierung der ungereinigten Fragmente über 24 Stunden konnte experimentell ein Transplantationserfolg nachgewiesen werden (105). Demnach scheint die feine Isolierung keine Notwendigkeit darzustellen, wenn das Gewebe weitgehend frei von exokrinen Enzymen ist. Nach Untersuchungen von Gerasch (24) wird eine Verunreinigung mit über 5-facher Menge an exokrinem Gewebe ohne Einfluß auf den Transplantationserfolg toleriert. Eine 30-fache Verunreinigung führte experimentell nach intraportaler Transplantation kurzfristig zum Tode der Tiere.

2. Experimentelle Inseltransplantation

Tierexperimentell wurden als Implantationsorte für die isolierten Inseln Subcutangewebe, Muskel, Peritonealhöhle, subkapsuläres Nierenparenchym, Nebenhoden, Lunge, Leber und Milz getestet. Am besten eignete sich dabei die Implantation in die Leber über die Pfortader oder die Implantation in die Milz (37). Ein bedeutsamer Anstieg des Pfortaderdruckes wurde bei der Verwendung gereinigter Inseln nicht gemessen (58). Lediglich bei Verwendung einer Gewebesuspension ohne besondere Trennung vom exokrinen Gewebe stellte Kretschmer (43) bei Versuchen mit Hunden eine Erhöhung des Pfortaderdruckes von 6,5 auf 21,9 cm H₂O fest. Federlin (17) hält nach Austestung bei der Ratte Leber und Lunge als Implantationsorte für geeignet. Besondere Leberfunktionsstörungen wurden bei intraportal Transplantation im Tierexperiment nicht festgestellt.

Sutherland (113) erachtet beim Hund die Transplantation in die Milz für geeigneter, da der Hund besonders empfindlich auf eine portale Hypertension reagiert. Die Implantation in die Peritonealhöhle ist weniger effektiv, da mehr Inselgewebe für eine erfolgreiche Transplantation benötigt wird. Eine Leberpassage des sezernierten Insulins erscheint wichtig. So konnte nach Transplantation von Inseln unter die Nierenkapsel eine deutliche Funktionsverbesserung durch die Anlage eines Porto-renalen Shunts erreicht werden (9, 12).

Bedeutungsvoll für das Überleben der transplantierten Inseln ist die Eingabe direkt in das Gefäßsystem, womit sofort eine Blutversorgung gewährleistet ist. Aus diesem Grunde bieten sich Lunge und Leber mit doppeltem Kreislaufsystem an.

Im Tierexperiment konnte bei Autotransplantationen und bei Transplantationen zwischen isologen Rattenstämmen die endokrinologische Wirksamkeit der transplantierten Inselzellen langfristig nachgewiesen werden. Als allogenes Transplantat verlieren die Zellen nach kurzer Funktionsdauer jedoch infolge Abstoßungsreaktionen ihre Wirkung (30). Studien an Ratten zeigen, daß isolierte Zellen vergleichsweise zu komplett transplantierten Pankreasorganen immunologisch hoch empfindlich reagieren (115), wobei humorale und zelluläre Abwehrmechanismen bedeutsam sind (83). Möglicherweise werden durch die Isolationstechnik freigesetzte 'maskierte Antigene' zu Angriffspunkten (94).

Nach Inselallotransplantation ohne Immunsuppression wurde bei Ratten eine Normoglykämie für 1 - 4 Tage, mit Prednisolon 1 - 5 Tage, mit Antilymphozytenserum 9 - 20 Tage und mit Leberextrakt und Antilymphozytenserum für 13 - 68 Tage erreicht. Kretschmer (45) nahm Allotransplantationen in die Milz mit und ohne Immunsuppression vor, wobei sich unterschiedliche und schwer zu interpretierende Erfolge ergaben. Lorenz (58) erreichte bei intraportaler Applikation ohne Immunsuppression beim Hund eine Funktionsdauer um 3 Wochen. Bei Auswahl geeigneter Spender und Immunsuppression konnte Lorenz dagegen langfristig Funktionen nachweisen (59).

Durch Gewebetypisierung und Behandlung mit Antilymphozytenglobulin konnte Beyer (5) bei Ratten die Funktion transplanterter Inseln deutlich verlängern. Nash (85) erreichte durch Vorbehandlung mit Kieselsäure bei intraperitonealer Transplantation eine erhebliche Funktionsverlängerung. Siliziumdioxid hat eine supprimierende Wirkung auf die Makrophagen.

Bei H₁-Inkompatibilität ergeben sich sehr kurze Überlebenszeiten der transplantierten Inseln, wobei möglicherweise angezeigt wird, daß die Isolierung vom umgebenden Gewebe die Empfindlichkeit gegen Abstoßung erhöht (11). Entsprechend zeigt sich auch bei der Transplantation von Pankreassegmenten eine längere Funktionsdauer. Bei Histokompatibilität und bei Verwendung fetaler Pankreata kommt es ebenfalls zur Abstoßung, die jedoch vergleichsweise verzögert abläuft. Auch durch Kultivierung von Inseln kann die Abstoßung prolongiert werden (61). Jedoch konnte Jonasson (35) diesen Effekt bei Versuchen mit Affen nicht bestätigen.

Die Transplantation fetaler oder neonataler Pankreasinseln hat Vorteile im Hinblick auf Präparation, Ausbeute und Funktion (11, 65). Fetale Inselzellen entwickeln zunehmende Funktionsfähigkeit, wenn der Stoffwechsel zunächst teilweise durch Insulin reguliert wird (79). Mirkovitch (75) hält nach seinen Experimenten eine totale Pankreatektomie bzw. diabetische Stoffwechsellage sofort bei der Transplantation für erforderlich. Demnach kommt es nur bei Hyperglykämie zu einer Funktionsaufnahme der transplantierten Inseln.

3. Klinische Inseltransplantation

Najarian (81) berichtete 1977 erstmals über Erfahrungen mit der Inseltransplantation beim Menschen. Nach Nierentransplantationen wurden 7 Empfänger immunsuppressiv behandelt. Bei intraportaler Applikation der Inseln ging der Insulinbedarf für die Dauer von 2 - 9 Wochen zurück. In einem Falle war der Insulinbedarf 18 Monate reduziert. Der Pfortaderdruck stieg infolge der Transplantation nicht an, Leberfunktionsstörungen traten nicht auf. Die unzureichende Funktion wurde unter anderem auch auf die ungenügende Inselausbeute unter Verwendung der Fikoll-Gradiententechnik zurückgeführt.

Largiadèr berichtete kürzlich über einen eindrucksvollen Erfolg nach Inselalлотransplantation (53). Mit einer Nierentransplantation erfolgte gleichzeitig die Transplantation von grob getrenntem Inselgewebe in die Milz. Hiernach bestand über ein Jahr lang kein Insulinbedarf.

Erfolgreiche Autotransplantationen nach Pankreasresektionen wegen chronischer Pankreatitis wurden ebenfalls beschrieben (15, 113). In einigen Fällen wurde der Insulinbedarf durch die Transplantation vermindert. Najarian (89) führte nach subtotaler Resektion die intraportale Autotransplantation von grob getrenntem Pankreasgewebe durch. Von 3 Fällen bestand hiernach bei 2 Patienten kein Insulinbedarf. Wolff (127) berichtet über 8 Autotransplantationen, darunter 2 Patienten mit subtotaler Pankreasresektion. Hiernach bestand 4 mal kein Insulinbedarf, wobei jedoch in einem Falle sich nach mehreren Wochen wieder eine diabetische Stoffwechsellaage entwickelte. Nach dem neuesten Transplantationsregister (60) erfolgten bis Dezember 1980 insgesamt 59 Autotransplantationen nach Duodeno-pankreatektomie oder subtotaler Pankreatektomie. 28 Patienten wurden zumindest für mehrere Monate frei von Insulinsubstitution.

Bei 68 Allotransplantationen bis 1980 (60) wurden nur 4 Patienten für eine begrenzte Zeit unabhängig von exogener Insulinzufuhr und in anderen Fällen gelang eine Reduzierung der Insulindosis bis zu 70 %. Eine besondere Empfänger-Spender Auswahl erfolgte dabei nicht und von den einzelnen Transplantationszentren werden keine genauen Angaben über die Zahl der transplantierten Inseln gemacht. Jedoch muß betont werden, daß infolge der Transplantation keine postoperativen Komplikationen auftraten.

Eine Beobachtung bezüglich Entwicklung eines Pfortaderhochdruckes durch die Transplantation wird von Mehigan (71) mitgeteilt. Nach intraportaler Autotransplantation grob isolierter Inseln kam es bei einem Patienten zu disseminierten Thrombosierungen mit portaler Hypertension und Verbrauchskoagulopathie. Dieser Effekt wurde auf Thromboplastin zurückgeführt, welches durch die Gewebeaufbereitung frei wird. Bei experimentellen Studien unter Behandlung der Transplantate mit Heparin und Trasylol konnten solche schwerwiegenden Nebenwirkungen vermieden werden.

V. Experimentelle Methodik

1. Diabetesmodell

a. Vorgehen bei Duodeno-pankreatektomie

Es wurden 16 verschiedenrassige und Bastardhunde mit einem Gewicht von 11 - 25 kg operiert. Nach einer Nahrungskarenz von etwa 18 Stunden erfolgte unmittelbar präoperativ eine Prämedikation mit Propionyl-Promazin (Combelen^R) 3 - 5 ml i.m. 10 Minuten später wurde eine Braunüle in eine Vorderlaufvene gelegt und 1 ml/kg KG Chloralose i.V. verabreicht. Hiernach wurden die Tiere intubiert und bei Spontanatmung belassen. Ein EKG - Monitor diente der Herzfrequenzüberwachung. In 2 Fällen kam es intraoperativ zu Hypoxie mit Bradykardie und erforderlicher Beatmung. Bei auftretender Wachreaktion erhielten die Tiere 1 ml Pentobarbital (Nembutal^R) i.V. Vorbereitung des Operationsfeldes und Einhaltung steriler Bedingungen intraoperativ entsprachen dem Vorgehen in der Humanmedizin.

Nach medianer Laparotomie wurde das große Netz, welches die Dünndarmschlingen schützend umhüllt, in den linken Oberbauch abgedrängt. Die Dünndarmschlingen wurden mit einem feuchten Bauchtuch caudal verlagert und der Magen mit einem Rehnschen Haken gehalten, so daß der unter dem Magen gelagerte Pankreaskörper frei lag. Dieser hat enge Beziehungen zu den Milzgefäßen. Kleinere Gefäße mußten sorgfältig zwischen Ligaturen durchtrennt werden und teilweise konnte der Peritonealüberzug scharf am Pankreasober- und Unterrand durchtrennt werden. Duodenalwärts strahlt konstant ein größerer Ast der Milzarterie ins Pankreas. Man erleichtert sich die Präparation des Pankreaskörpers, indem man die pankreasseitigen Ligaturen lang beläßt und durch Zug an den Fäden die einstrahlenden Gefäße darstellt.

Nach Präparation des Pankreaskörpers wurde das mobile Duodenum hervorluxiert und der meist gut ausgebildete Proc. uncinatus des Pankreas dargestellt. Die A. pankreaticoduodenalis inf. wurde zwischen Ligaturen in Höhe der vorgesehenen Resektionsgrenze des Duodenums durchtrennt. Die weiteren oralen Duodenalabschnitte wurden zwischen Pankreas und V. portae bis zu den Gebilden des Lig. hepatoduodenale mobilisiert. Sodann erfolgte die Festlegung der oralen Resektionsgrenze des Magenantrums und Skelettierung der aboralen Magenanteile. Schließlich konnte das Lig. hepatoduodenale zwischen Daumen und Zeigefinger der linken Hand gefaßt und präpariert werden. Choledochus, A. und V. pankreaticoduodenalis sup. wurden zwischen Ligaturen durchtrennt. Hiernach begann die warme Isschämiezeit des Pankreas. Nach Anlegen von Klemmen an den vorgesehenen Resektionsgrenzen wurde das Präparat entnommen (Abb. 3).

Nach Resektion von Antrum, Pylorus, Duodenum und Pankreas wurde zur Darstellung der Gallenblase ein feuchtes Bauchtuch hinter die Leber gebracht und nach Punktion der Gallenblase erfolgte die offene termino-laterale Anastomosierung mit einer Jejunumschlinge mittels fortlaufender allschichtiger Chromcatgutnaht und einzelnen Serosanähten. Das obere Jejunum kann durch das Treitz'sche Band leicht retrocolisch mobilisiert werden, so daß die Anastomosierung mit dem Magen End-zu-End durch fortlaufende Chromcatgut-Allschichtennaht und einzelnen Serosanähten erfolgen kann (Abb. 4 u. 5).

Das Dünndarmkonvolut wurde wieder mit großem Netz umhüllt, in Richtung der Anastomosen eine Wunddrainage für 24 Stunden eingelegt, und die Bauchdecke schichtweise verschlossen.

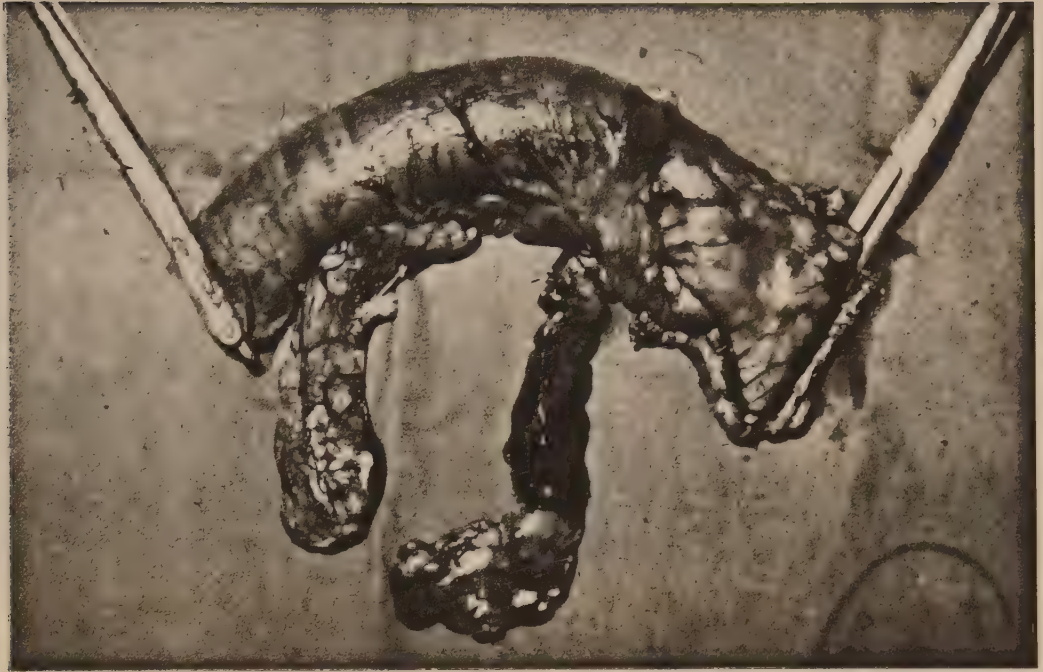


Abb. 3 Operationspräparat nach Duodeno-pancreatektomie mit Antrum, Pylorus, Duodenum sowie Corpus und Proc. uncinatus des Pankreas



Abb. 4 Operationssitus bei Duodeno-pancreatektomie
nach Anastomosierung

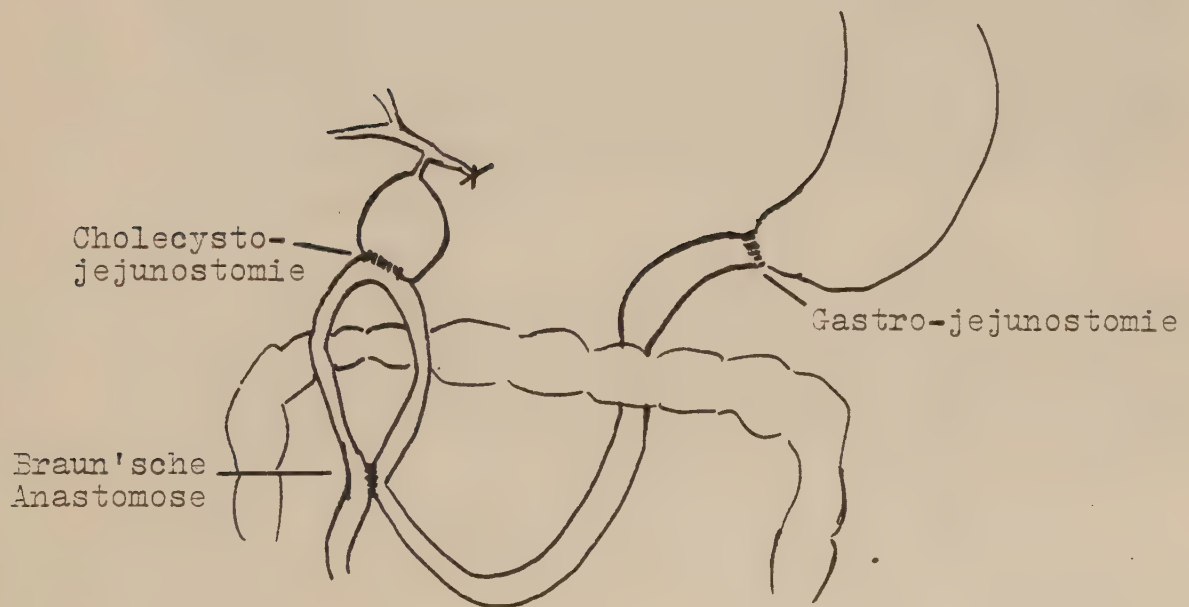


Abb. 5 Skizze der Anastomosierungsformen bei Duodeno-pancreatektomie

b. Vorgehen bei der Pankreatektomie nach Markowitz

Bei insgesamt 35 Tieren entsprachen die Vorbereitungen dem Vorgehen nach Duodeno-pankreatektomie. In gleicher Weise wurde auch zunächst der Pankreasschwanz präpariert.

Um eine längere Isschämiezeit des Pankreas zu vermeiden, haben wir während der weiteren Präparation den Hauptast aus der Milzarterie zunächst noch belassen. Es wurde das Duodenum mit Pankreaskopf und Proc. uncinatus vor die Bauchdecke luxiert und A. und V. pankreatico-duodenalis sup. und inf. dargestellt. Nach scharfer Durchtrennung der Pankreaskapsel stellte sich der gesamte Verlauf der Gefäße innerhalb des Pankreasgewebes dar. Die zum Pankreas verlaufenden Äste wurden zwischen Ligaturen durchtrennt, wobei das Pankreas dorsal und ventral präpariert werden mußte. Ebenso erfolgte die Abtrennung der duodenumnahen Anteile des Pankreas. Oft ließen sich bei der Präparation des Gewebes auch größere Blutungen nicht vermeiden. Da die Ligaturen immer gefäßnahe erfolgten, um nicht Gewebereste zurückzulassen, mußten wir uns ständig über noch vorhandene Pulsationen der duodenumnahen Arkaden vergewissern. Die Abb. 6 zeigt den Operationssitus nach Freipräparation der Arterie und Entnahme des Präparates, und die Abb. 7 zeigt das Operationspräparat.

Für eine sorgfältige Präparation wurden etwa 2 Stunden benötigt. Nach Entfernung des Pankreas und Überprüfung vorhandener Pulsation der A. pankreaticoduodenalis wurde ebenfalls für 24 Stunden eine Wunddrainage eingelegt.



Abb. 6 Operationssitus bei Pankreatektomie nach Markowitz mit freipräparierter A. pancreaticoduodenalis



Abb. 7 Operationspräparat nach Pankreatektomie mit Darstellung des Gefäßbettes

c. Postoperative Versorgung

Die Tiere wurden 2 - 3 Tage nach der Operation in einer speziellen Wärmekammer gehalten und bei Unruhezuständen, die infolge der Chlorhalose-Medikation unmittelbar postoperativ häufig zu beobachten waren, wurde 2 - 5 mg Valium i.V. gegeben. 2 Tage postoperativ erfolgte parenterale Flüssigkeitszufuhr in Form von Elektrolytlösungen, etwa 2 ml/kg KG/h. Jedoch wurde bereits am ersten Tage etwas Wasser oral erlaubt. Auch bei der Nahrungsaufnahme nach dem 2. postoperativen Tag trat häufig Erbrechen auf, wonach manche Tiere dann nur schwer wieder an den Fressnapf zu bringen waren.

Eine Substitution der exokrinen Pankreasfermente ist nach Pankreatektomie erforderlich. Dazu erhielten die Tiere 2 - 3 g Pankreon^R in Pulverform unter das Futter gemischt. Wir konnten durch zusätzliche Verfütterung von hochkalorischer sog. Astronautenkost (Vivasorb^R) die auftretende Kachexie zumindest hinauszögern.

Die eingelegte Wunddrainage wurde nach 24 Stunden entfernt, und die Wunde frei von Verbänden belassen. Die Hautfäden wurden am 10. postoperativen Tag entfernt.

2. Methodik der Inselisolierung

a. Distension und Homogenisierung

Bei der Präparation des Pankreas zur Autotransplantation konnte die Isschämiezeit verkürzt werden, indem der duodenalwärts gelegene Hauptast der Milzarterie zuletzt ligiert wurde. Bei der Duodeno-pankreatektomie beließen wir die A. pankreaticoduodenalis bis zur Entnahme. Unmittelbar nach der Entnahme wurde der Pankreasgang mit einer Knopfkanüle kanüliert und das Organ mit 30 bis 40 ml kalter Hanks Lösung und 50 mg Kollagenase distendiert (Abb. 8). Hiernach ergab sich für die Isolierung noch eine ausreichende Zeit, ohne daß Schäden infolge der Isschämie zu befürchten waren, da nach Untersuchungen von Moser und Largiadèr (76) in der Regel eine warme Isschämie bis zu 2 Stunden toleriert wird. Die Abbildung 9 zeigt das aufgelockerte Pankreasgewebe nach Distension.

Nach Abpräparation der Kapselanteile erfolgte die Zerkleinerung in Partikel von 2 - 4 mm Durchmesser durch raschen Scherenschlag von 2 parallel geführten Scheren im Becherglas. Eine Vereinfachung ergab die Zerkleinerung in einem Gewebehomogenisator (Colworth Stomacher 80). Dazu überführten wir die kalte Hanks Lösung mit dem grob zerteilten Gewebe in einen Plastikbeutel bestimmter Elastizität. Durch rasch wechselnden Druck von 2 großflächigen Platten erfolgte die feine Gewebezerteilung (Abb. 10).

Ein Vergleich der histologischen Präparate des so gewonnenen Materials mit den Präparaten der von Hand geschnittenen Gewebe zeigte infolge der Gewebehomogenisation vermehrt Zelltrümmer und Inselfragmente. Die vereinfachte Handhabung wird durch eine etwas geringere Ausbeute an intakten Inseln erkauft.

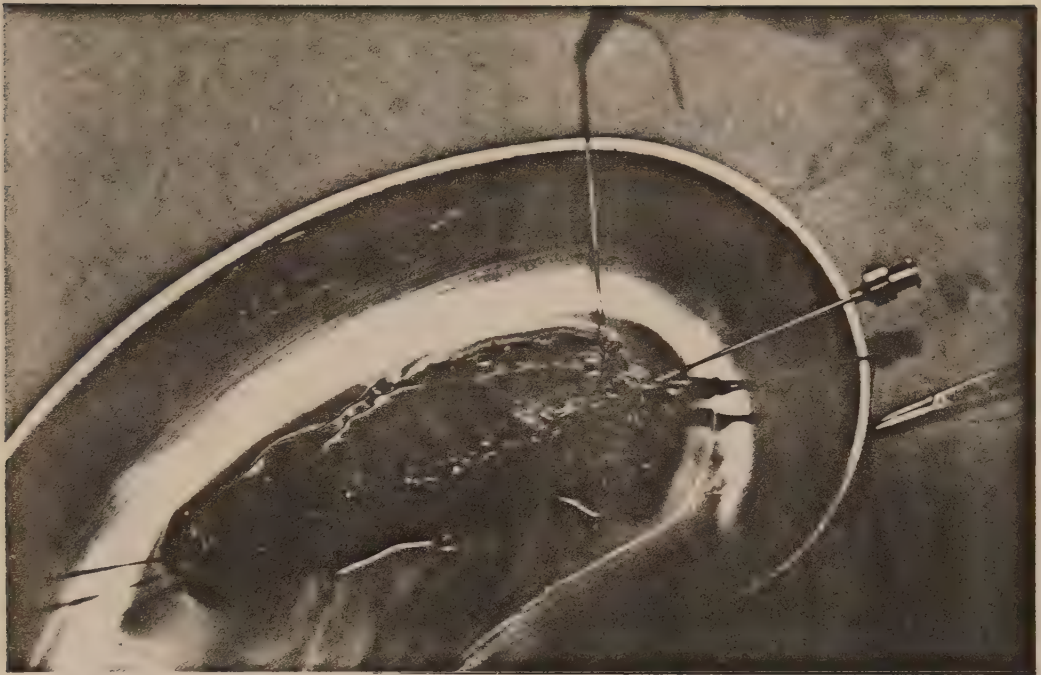


Abb. 8 Der milzseitige Anteil des Pankreas wird mit einer Knopfkannüle distendiert



Abb. 9 Nach Distension stellen sich die Läppchen des Pankreas deutlich aufgelockert dar

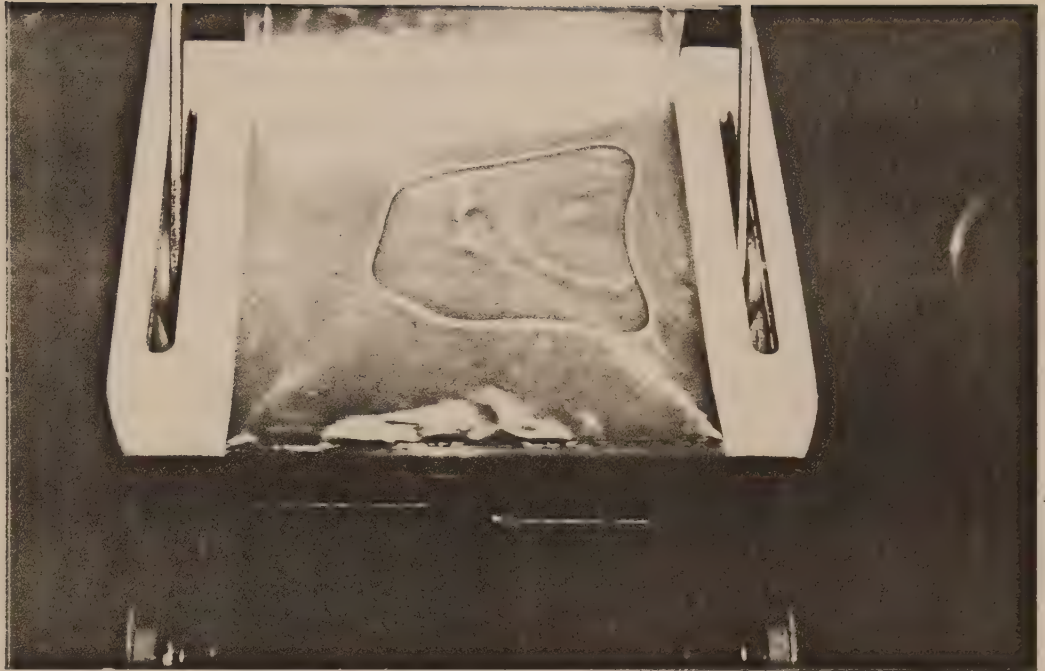


Abb. 10 Homogenisiertes Pankreasgewebe nach Bearbeitung im Gewebehomogenisator (Colworth Stomacher 80). Die großflächigen Druckplatten sind unten gerade noch erkennbar

b. Digestion

Die Kollagenaseinkubation erfolgte im Wasserbad bei 37 °C unter kräftigem Schütteln per Hand oder gleichzeitig mit der Homogenisation im Gewebehomogenisator. Bei letzterem Vorgehen wurde das gesamte Gerät im Brutschrank erwärmt. Abgesehen vom Nachteil vermehrt anfallender Zelltrümmer erreicht man durch die Inkubation im Gewebehomogenisator einen innigeren Kontakt des Gewebes mit der Enzymlösung.

Verwendet wurde Kollagenase Serva^R, die sich nach unseren Aktivitätsbestimmungen am besten eignete. Die Aktivitäten verschiedener Serien unterscheiden sich bei allen Präparaten, da es sich um ein Enzymgemisch handelt, welches von Bakterien gebildet wird. Neben der Kollagenase sollen noch andere Enzyme dieses Gemisches für die Trennung von Bedeutung sein. Wir haben je nach Qualität 2 - 4 mg Kollagenase pro Gramm Pankreasgewebe zugegeben, entsprechend 1000 mU Kollagenase-Aktivität.

In Vorversuchen hat sich als optimale Inkubationszeit die Inkubation über 15 bis 20 Minuten erwiesen. Die Inkubation wurde dabei nach dem Aspekt der Partikelgrößen im Homogenisat und nach der histologisch nachweisbaren Ausbeute im Isolat variiert.

c. Filtertrennung

Ein besonderer Vorteil zur Isolierung schien die Verwendung eines Filterverfahrens zu bieten, welches von Offord (89) zur Isolierung von Inseln aus Rattenpankreatata beschrieben wurde. Zur Aufarbeitung des Pankreas eines Hundes mußten die Dimensionen entsprechend geändert werden. Außerdem haben wir eine einfach zu handhabende Apparatur eingerichtet und zur ausreichenden Spülung ein Durchlaufsystem angebracht.

Nach der Homogenisierung des Pankreasgewebes und nach Kollagenaseandauung erfolgte die Trennung der exokrinen und endokrinen Anteile im Filtersystem. Die ausreichende Größendifferenz zwischen abgespaltenen exokrinen Zellen, Inseln und unvollständig angedauten Gewebeanteilen (Kapselanteile, Gangsystem, Gefäß- und Bindegewebe) erlaubte diese Trennung. Der oberste Grobfilter mit 1000 μm Porendurchmesser retinierte die großen fibrösen Anteile, und der 2. Filter erlaubte nur noch Partikeln unter 300 μm die Passage. Durch den untersten Filter mit 40 μm Durchmesser wurden die exokrinen Zellen eliminiert. Zwischen den beiden unteren Filtern sammelten sich vermehrt die Inseln. Die Abbildung 11 zeigt schematisch das Filtersystem.

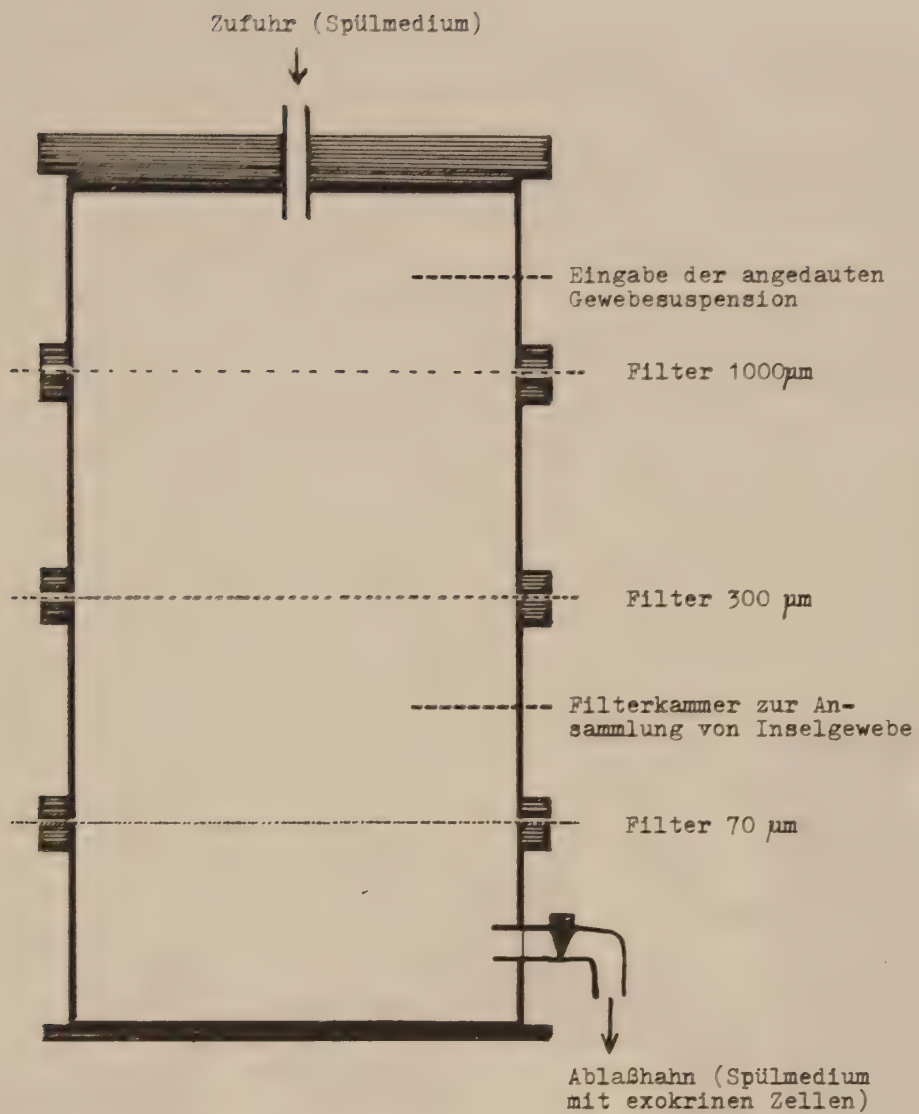


Abb. 41 Schematische Darstellung des benutzten Filtersystems zur Trennung der Inseln vom angedauten exokrinen Pankreasanteil

Unser verwendetes Glaszylindersystem hatte einen Innendurchmesser von 10 cm und eine Höhe von 40 cm. Die Abbildung 12 zeigt den Filter im Einsatz. Als Spülflüssigkeit wurden pro Isolierung 6 l kalte Hanks Lösung verwendet. Abbildung 13 zeigt den obersten Filter mit aufgefangenen groben Partikeln, fibrösen Kapselanteilen, Gefäß- und Ganganteilen.

Nach dem Spülvorgang wurde die Suspension zwischen den beiden unteren Filtern mit einer Spritze aufgenommen und nach Abtrennung eines Anteiles für die histologische Untersuchung zur Transplantation vorbereitet.



Abb. 12 Glasfiltersystem während des Spülvorganges



Abb. 13 Oberster Filter nach der Spülung mit aufgefangenen groben Partikeln und Kapselanteilen 70

3. Transplantation

Die aus dem Filter entnommene Gewebesuspension wurde in 200 - 300 ml Hanks Lösung aufgenommen. Sodann erfolgte die Kanülierung eines Astes der V. mesenterica sup. und Einbringen eines Katheters mit einem Mindestdurchmesser von 1 mm zur Pfortader. Die Transplantation erfolgte bei einem Teil der Tiere gezielt in einen Leberlappen, wobei die Lage der Katheterspitze röntgenologisch kontrolliert werden konnte (Abb. 14).

Vor und nach der Transplantation wurde der Pfortaderdruck über den liegenden Katheter nach dem Steigrohrprinzip gemessen. Die Infusion der Gewebesuspension in die Leber erfolgte über einen Zeitraum von 15 - 20 Minuten. Nach der Transplantation haben wir bei einigen Tieren eine Portographie durchgeführt, um gröbere Veränderungen im Pfortadersystem erkennen zu können. Dazu wurden 20 ml Angiographin über den Katheter injiziert. Zu Röntgenaufnahmen auf dem Operationstisch stand ein C-Bogen zur Verfügung.

Während bei 18 Tieren die intraportale Transplantation als Autotransplantation durchgeführt wurde, erhielten 10 Hunde nach Pankreatektomie ein Allotransplantat. Als Spendertiere dienten Hunde, die z.B. zu Blutspendezwecken für andere Versuche geopfert wurden. Nach rascher Entnahme unter sterilen Bedingungen erfolgte die Aufbereitung in der angegebenen Weise, während gleichzeitig die Pankreatektomie beim Empfängertier durchgeführt wurde, um dann sofort die Transplantation über die Pfortader in die Leber anzuschließen.



Abb. 14 Röntgenologische Kontrolle der Katheterlage
vor Transplantation gezielt in ein Lebersegment

4. Labormethoden und Auswertung

Die Blutzuckerbestimmungen erfolgten teilweise routinemäßig mit dem Beckmann-Autoanalyser nach der Glukoseoxydasemethode, teilweise wurden aus technischen Gründen zur Vereinfachung Schnellteste mit dem Reflomat System (Boehringer) durchgeführt, da in der Tierversuchsanlage keine aufwendigeren Laborbestimmungen möglich waren.

Die Bestimmung der Leberwerte SGOT, SGPT, LDH, Bilirubin und der alkalischen Phosphatase sowie die Bestimmung der Serumamylase erfolgten nach den Standardbestimmungsmethoden im klinischen Labor, wobei eine regelmäßige Kontrolle nicht durchgeführt werden konnte.

Mit den Blutentnahmen für die Blutzuckerbestimmungen wurden gleichzeitig Seren für die Bestimmung der Insulinspiegel gewonnen. Die Bestimmungen erfolgten präoperativ, postoperativ, dann über eine Woche täglich und anschließend in höchstens wöchentlichen Abständen. Bei den Glukosebelastungstesten wurde jeweils auch der Insulinspiegel bestimmt.

Zur Insulinbestimmung bzw. Bestimmung des immunreaktiven Insulins (IRI) wurde der Phadebas^R Insulin Test (Pharmacia Diagnostics, Uppsala) verwendet. Im Prinzip wird eine Probe des zu untersuchenden Serums mit einer festgelegten Menge von jodmarkiertem Insulin (Insulin-¹²⁵J) und einer bestimmten Menge eines Immunadsorbens versetzt. Dieses Adsorbens besteht aus Sephadex-Partikeln, an die Antikörper gegen Insulin gekoppelt sind (Sephadex-Anti-insulin-Komplex). Nach der Inkubation werden die Partikel durch Zentrifugieren sedimentiert und gewaschen. Anschließend wird die an die Sephadexpartikel gebundene Radioaktivität gemessen. Mit zunehmendem Insulingehalt in der Inkubationsmischung nimmt die vom Immunsorbent

aufgenommene Radioaktivität ab. Die abnehmende Radioaktivität ist also ein Maß für die Höhe der Insulinspiegel. Durch verschiedene Eich- und Testlösungen wird die Zuverlässigkeit der Nachweismethode bei jedem Ansatz geprüft. Eine optimale Insulinbestimmung ist im Bereich von 3 - 320 μ U/ml möglich. In diesem Meßbereich ergibt sich eine Genauigkeit mit einem Variationskoeffizienten um 10 %. Im Meßbereich unter 2 μ U/ml steigt dieser Koeffizient bis über 20 % an.

Der Nachweis von C-Peptid gibt einen sicheren Hinweis für die Insulinproduktion, da es sich um das Spaltprodukt von Proinsulin handelt. Die Bestimmung aus menschlichen Seren ist mit immunologischen Methoden durchführbar. Der Nachweis mit gleichen Antikörpersubstanzen gelang jedoch beim Hund nicht, bzw. ergab auch bei gesunden Tieren einen Wert von Null, so daß auf den Nachweis verzichtet werden mußte, da eine spezielle markierte Substanz für das Hundeserum nicht zu beschaffen war.

Die Aufarbeitung des Lebergewebes zum histologischen Nachweis der Transplantate erfolgte bei den verstorbenen Tieren nach Formalinfixierung. Wurde der Versuch bei reduziertem Zustand des Tieres durch eine Laparotomie abgeschlossen, so erfolgte die Fixierung durch eine vitale Perfusion der Leber mit Bouin'scher Lösung über die Pfortader. Zur Färbung der Präparate wurden jeweils angegebene Standardmethoden verwendet.

Zur statistischen Auswertung der ermittelten Blutzuckerwerte und Insulinspiegel wurde der Student-t-Test herangezogen. Als Kontrollkollektiv diente sowohl bei der Autotransplantation als auch bei der Allotransplantation die Gruppe der 14 pankreaslosen Tiere. Trotz rechnerischen Aufwandes ergibt dieser Test bei Normalverteilung die zuverlässigste Aussage. Eine Signifikanz wurde bei $p < 0,02$ erkannt.

VI. Ergebnisse

1. Kontrolltiere

a. Postoperative Komplikationen

Die Operation selbst und der erste postoperative Tag wurden von allen Tieren überstanden. Im weiteren Verlauf war die Sterblichkeit vor allem nach Duodeno-pankreatektomie mit 8 von 16 Tieren hoch. Bei Pankreatektomie betrug sie mit 7 von 35 Tieren insgesamt 20 %. Als Todesursachen stellten wir der Häufigkeit nach Bronchopneumonien, Ileus infolge Torsion oder Invagination, Anastomoseninsuffizienz, protrahierter postoperativer Schock und Lungenoedem fest. Alle verstorbenen Tiere wurden zur Feststellung der Todesursache seziert. Die an postoperativen Komplikationen verstorbenen Tiere wurden sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Gruppe der transplantierten Hunde bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Auffallend war bei 4 Tieren der Kontrollgruppe eine Gangrän der Pfoten, die von Verletzungen am Gitter oder von Einstichstellen der Braunülen ausging. Wundinfektionen wurden häufig gesehen, jedoch kam es auch in der Kontrollgruppe rasch zu sauberer Granulierung und Sekundärheilung.

Auch bei ausreichender Substitution von Verdauungsfermenten verloren sämtliche Tiere ständig an Gewicht. Durch hochkalorische Kost ließ sich dieser Gewichtsverlust zwar hinauszögern. Eine Abnahme von etwa 20 % des Ausgangsgewichtes in den ersten beiden postoperativen Wochen war jedoch immer festzustellen.

b. Vergleich der Diabetesmodelle

Sowohl nach Duodeno-pankreatektomie als auch nach Pankreatektomie war der Blutzuckerspiegel bereits postoperativ auf über 200 mg % erhöht. Am ersten postoperativen Tag erreichten die Blutzuckerspiegel bis 310 mg % und lagen dann bis zum Tod der Tiere zwischen 300 und 500 mg %. Die Überlebenszeit nach Duodeno-pankreatektomie betrug 9 - 22 Tage bei einem Mittel von 13,4 Tagen, nach Pankreatektomie betrug sie 9 - 29 Tage bei einem Mittel von 17,2 Tagen. Hier ist die Todesursache nur im Zusammenhang mit der diabetischen Stoffwechsellage zu sehen, da Tiere mit postoperativen Komplikationen als Todesursache nicht berücksichtigt wurden.

Wir haben das Verhalten der Blutzuckerspiegel nach Duodeno-pankreatektomie und nach Pankreatektomie nach Markowitz gegenübergestellt (Abb. 15). Dabei ergibt sich praktisch eine Hyperglykämie gleichen Ausmaßes. Die Plasmainsulinspiegelbestimmungen ergaben Werte zwischen 0 und 2,2 uU/ml (Abb. 16), wobei sich signifikante Unterschiede in keiner postoperativen Phase feststellen ließen. Bei 3 Tieren dieser Gruppe wurde 8 Tage nach der Operation ein intravenöser Glukosetoleranztest durchgeführt, wobei sich nach dem steilen Blutzuckeranstieg ein sehr verzögerter Abfall zeigt (Abb. 17).

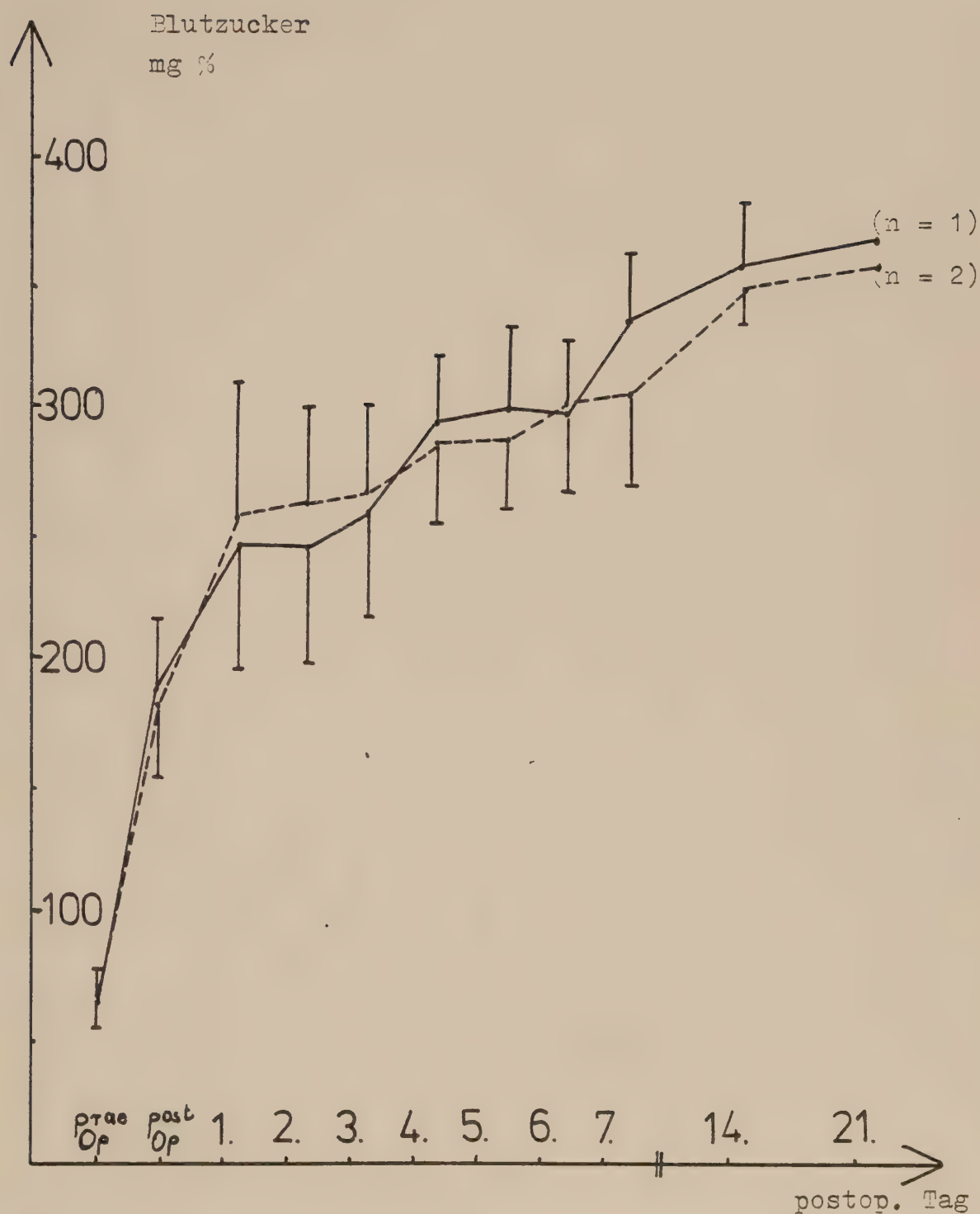


Abb. 15 Mittelwerte $\pm$ SE der Blutzuckerspiegel nach Duodeno-pankreatektomie (—) und nach Pankreat-ektomie (-----)

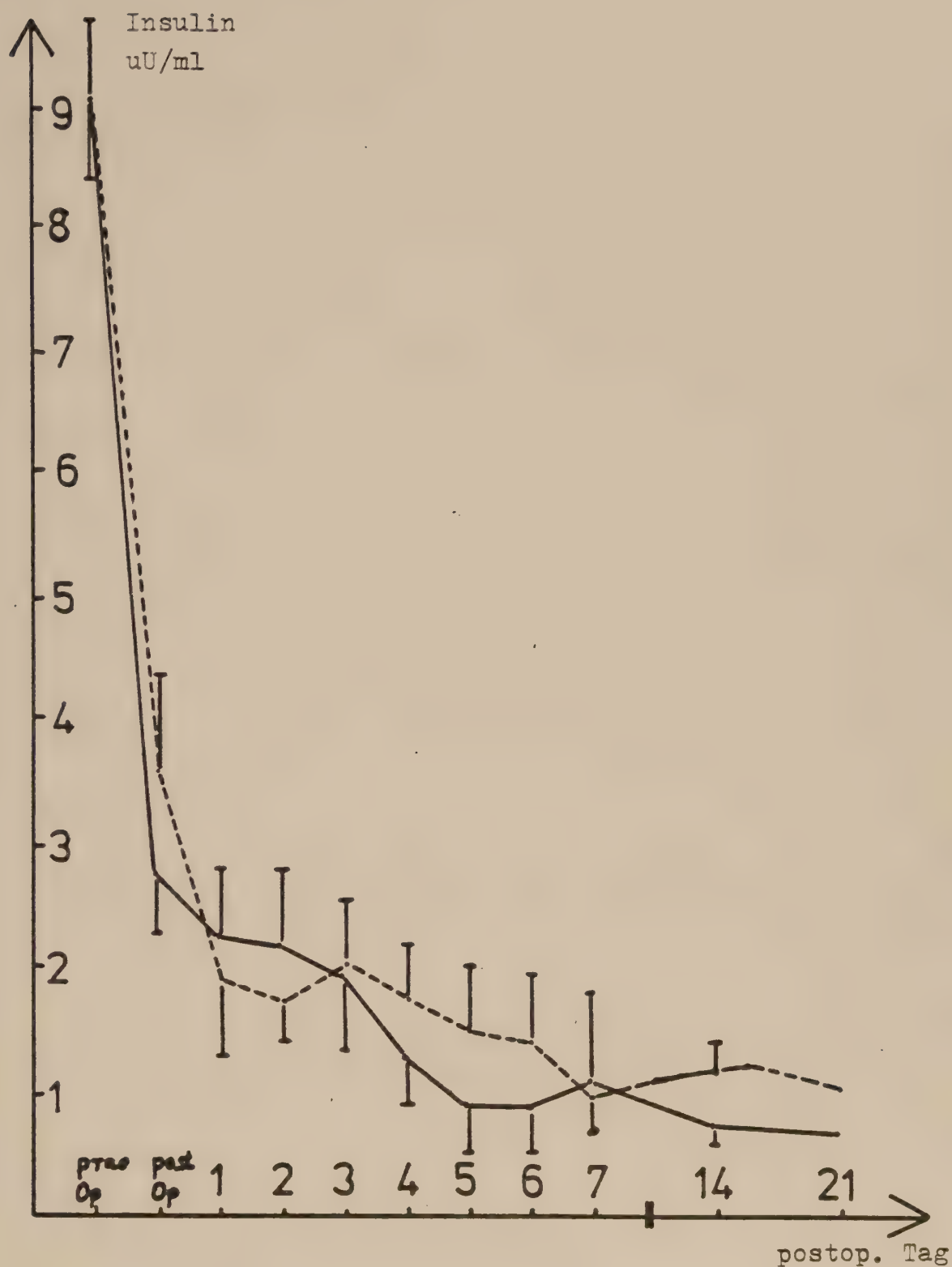


Abb. 16 Mittelwerte $\pm$ SE der Plasmainsulinspiegel nach Duodeno-pancreatektomie (—) und nach Pankreatektomie (-----)

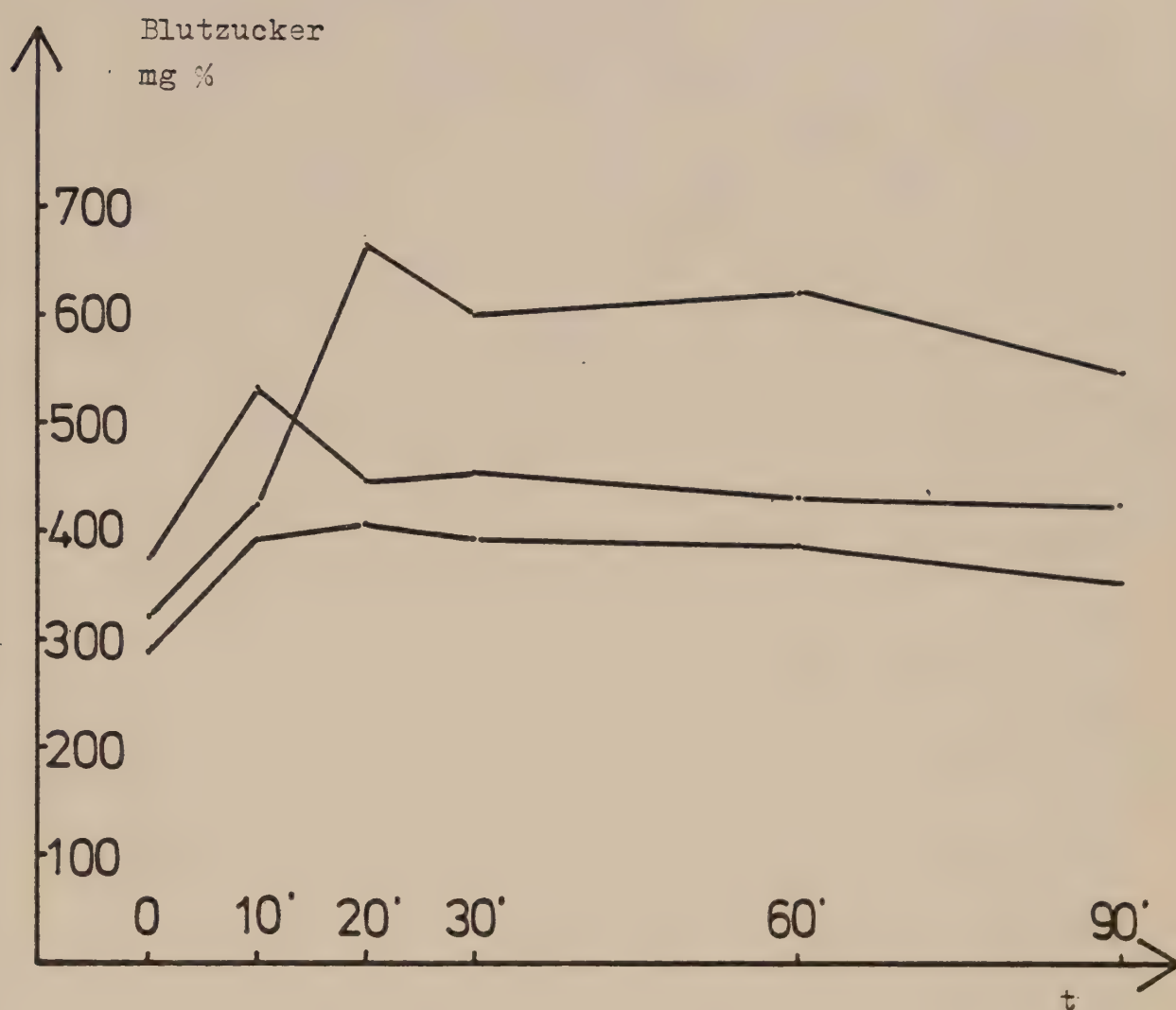


Abb. 17 Intravenöser Glukosetoleranztest bei 3 apankreatischen Tieren (0,5 g Glukose/kg KG)

2. Effektivität der Isolierung

Vom isolierten Material wurde jeweils ein geringer definierter Anteil zur histologischen Untersuchung entnommen und der Gehalt an Inseln im Transplantat bestimmt. Nach Färbung kann abgeschätzt werden, wie hoch die Verunreinigung mit exokrinem Anteil ist, und wie hoch die Inselausbeute insgesamt ist. Bei unserer Trennmethode zeigten die Präparate einen Anteil von 15 - 30 % endokriner Zellen (Abb. 18). Nach Zentrifugation von Homogenisaten konnten wir feststellen, daß durchschnittlich 0,8 g Gewebe transplantiert wurde. Wir sind davon ausgegangen, daß der endokrine Anteil des Pankreas 1 - 2 % ausmacht (27), und haben eine Effektivität unserer Isolierungsmethode von 16 - 28 % errechnet.

Bei der histologischen Untersuchung findet man im isolierten Material häufig Inselfragmente (Abb. 20). Es ist unklar, welche Bedeutung diese Inselanteile für die Transplantation haben. Auch läßt sich anhand von Zelltrümmern nachweisen, daß durch die Isolation viele Zellen geschädigt werden.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten wir intakte Inselzellen nachweisen (Abb. 21). Die Inselzellen zeichnen sich durch relativ große Zellkerne und intensive feinkörnige Granulierungen aus (Abb. 22). Im Vergleich hierzu enthalten die exokrinen Zellen reichlich endoplasmatisches Retikulum und größere Sekretgranula, die auf eine Lichtung zustreben (Abb. 23). Aufgrund dieser Untersuchungen kommt es durch die Inkubation mit Kollagenase offenbar kaum zu Zerstörung der B-Zellplasmamembran. Auch Schädigungszeichen mit Erweiterung des Retikulums und Degranulierung wurden nicht gesehen.

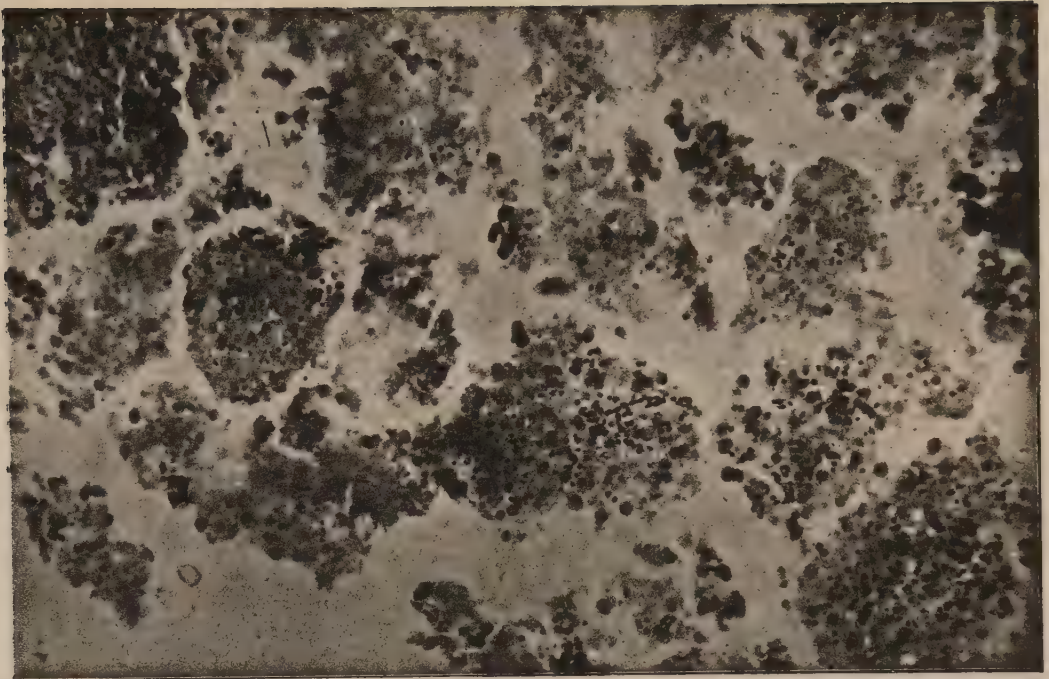


Abb. 18 Isoliertes Material mit exokrinen Zellen und mehreren Langerhansschen Inseln (HE-Färbung, 100-fach)

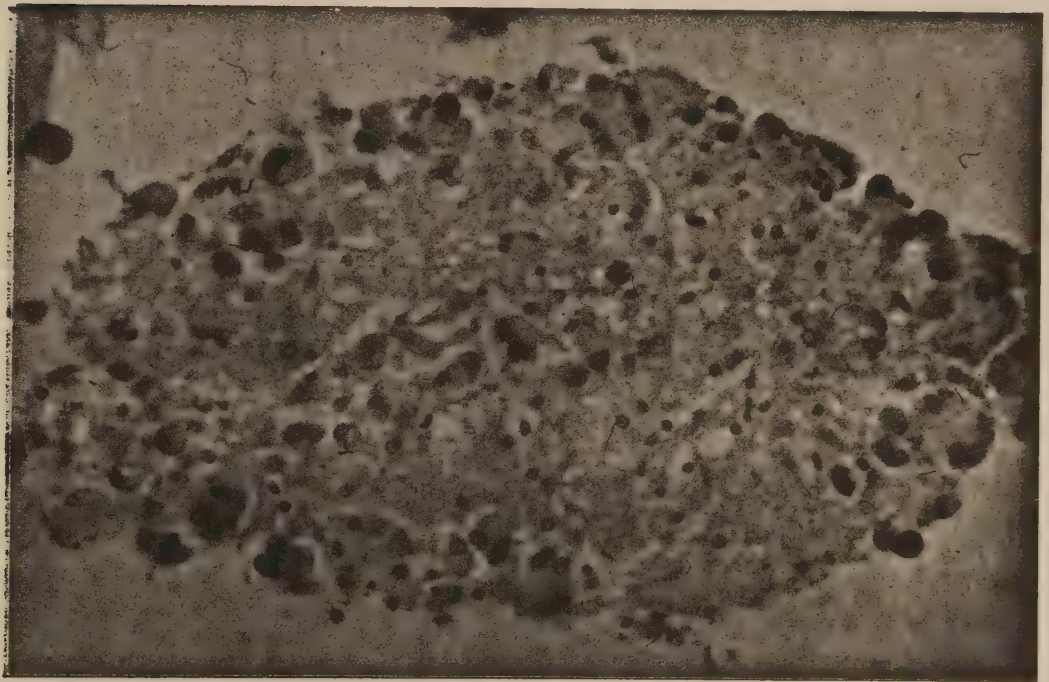


Abb. 19 Intakte isolierte Langerhanssche Insel (HE-Färbung, 250-fach)

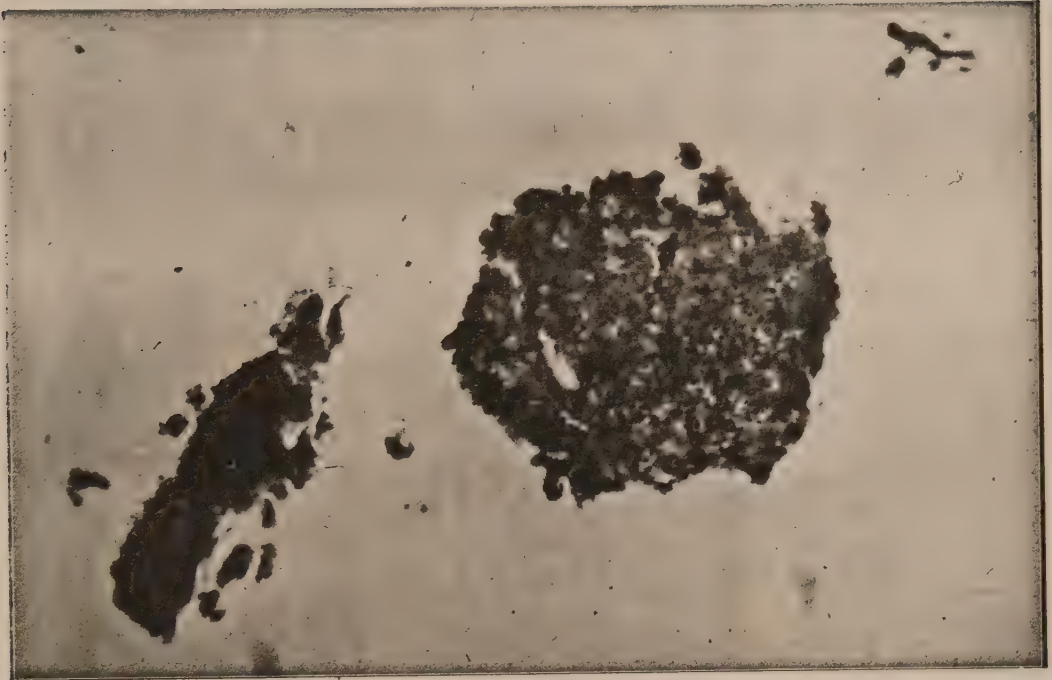


Abb. 20 Langerhanssche Insel mit anhaftenden einzelnen exokrinen Zellen und einem Inselfragment (PAS-Färbung, 100-fach)

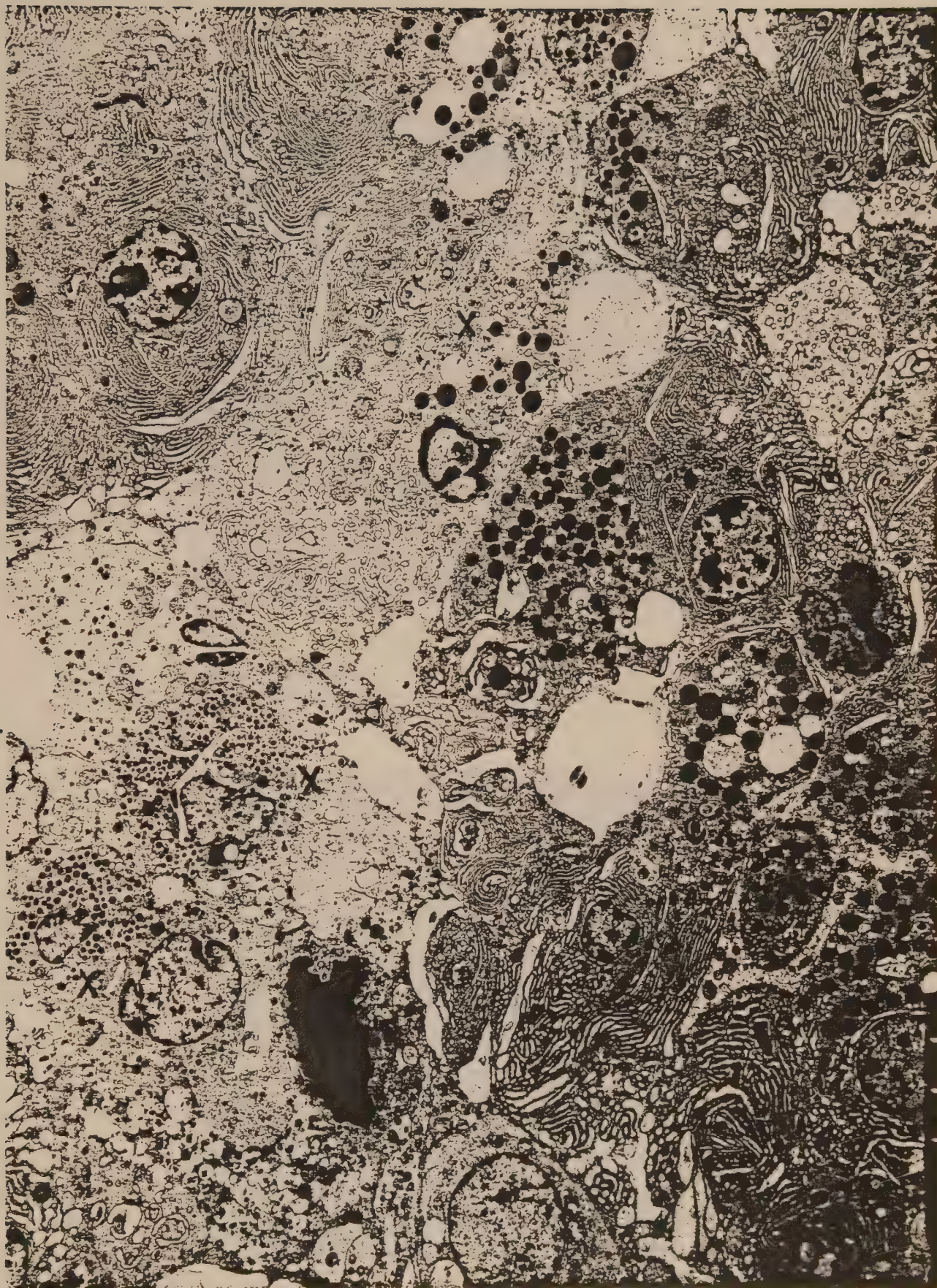


Abb. 21 Elektronenmikroskopische Darstellung aus dem isolierten Material mit exokrinen und endokrinen (x) Bestandteilen (5000-fach)

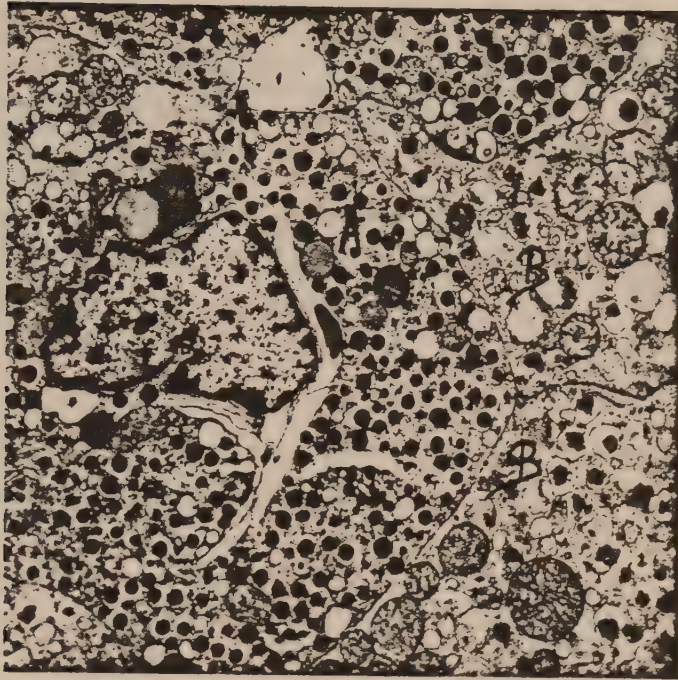


Abb. 22 Inselzellen (A- und B-Zellen) mit feinen Granulierungen und relativ großem Zellkern (10 000-fach)

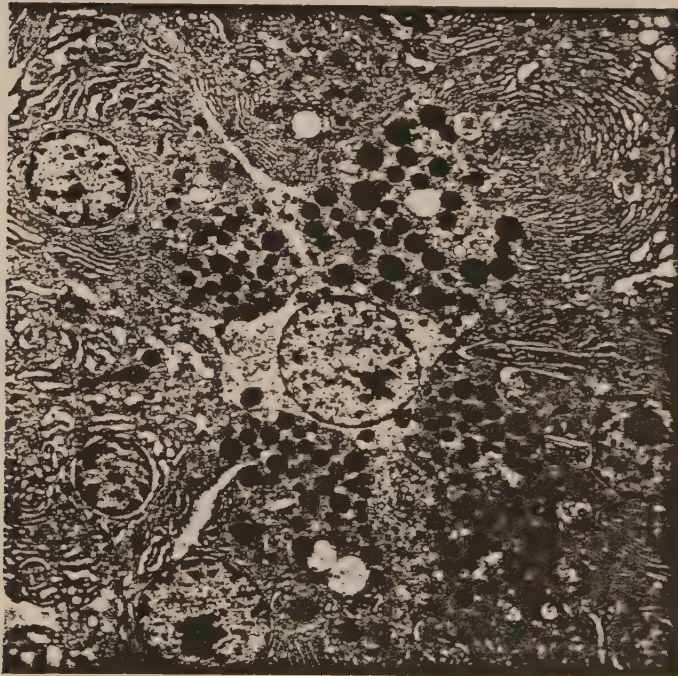


Abb. 23 Exokrine Zellen mit größeren Sekretgranula, die auf eine Lichtung zustreben (10 000-fach)

3. Verhalten des Pfortaderdruckes und der Leberwerte

Der Pfortaderdruck wurde jeweils vor und nach der Transplantation nach dem Steigrohrprinzip gemessen. Der normale Druck der Pfortader vor Transplantation lag im Durchschnitt bei 6,2 cm H₂O und stieg nach der Transplantation auf 7 - 21,5 cm, im Mittel auf 13,2 cm H₂O an. Bei 14 Tieren wurde der Versuch durch eine Laparotomie abgeschlossen und bei Versuchsabschluß der Pfortaderdruck kontrolliert. Es wurden Werte zwischen 6 und 12 cm H₂O registriert. Abbildung 24 veranschaulicht das Pfortaderdruckverhalten.

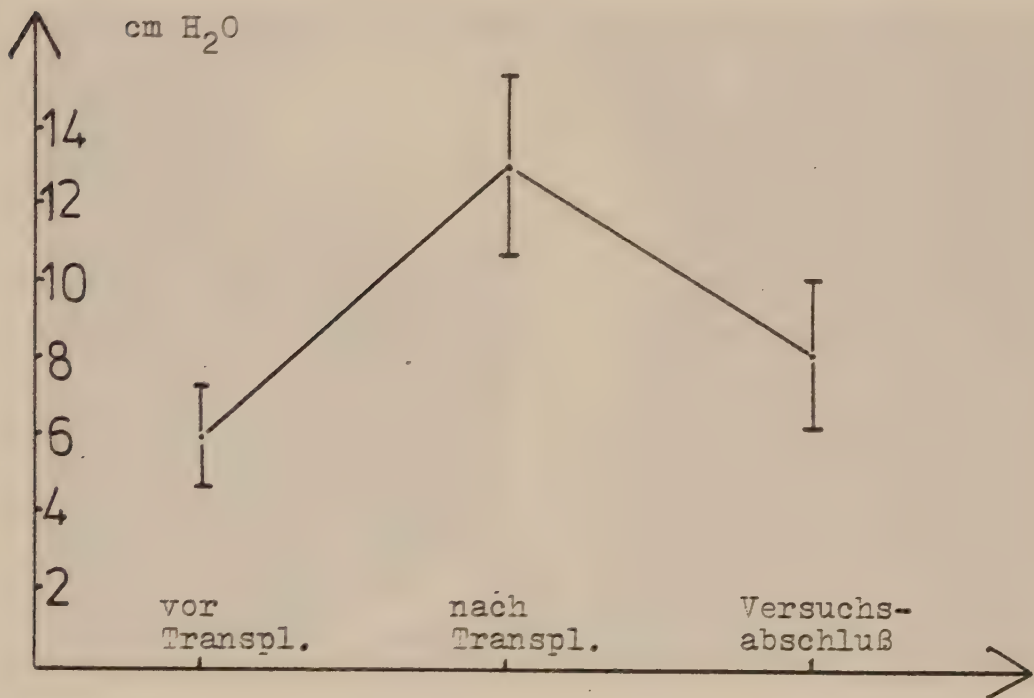


Abb. 24 Mittelwerte $\pm$ SE des Pfortaderdruckes im Verlaufe der Versuche

Zur Darstellung des intrahepatischen Pfortadersystems haben wir vor und nach Transplantation sowie bei Versuchsabschluß eine Portographie über einen Mesenterialvenenkatheter durchgeführt. Dabei wurde 20 ml Angiographin über den Katheter injiziert. Röntgenkontrollen nach Transplantation und bei Versuchsabschluß konnten keine nachweisbaren Obstruktionen im peripheren Pfortadernetz darstellen (Abb. 25).



Abb. 25 Portographie bei Versuchsabschluß mit unauffälliger Darstellung des peripheren Pfortadernetzes nach Inselautotransplantation

Von den bestimmten Leberenzymen war die SGOT und die SGPT nur während der ersten postoperativen Tage erhöht. Die SGPT blieb darüber hinaus noch bis etwa 14 Tage nach der Transplantation bis auf das 2-fache des Normalwertes erhöht. Nennenswerte andauernde Anstiege der alkalischen Phosphatase, der LDH und des Bilirubins stellten wir nicht fest. Die Bilirubinwerte lagen insgesamt ständig unter 1 mg %.

Die Amylase im Serum zeigte sich am 1. und 2. postoperativen Tag deutlich erhöht, fiel jedoch dann rasch bis unter die Norm ab.

Die Abbildung 26 gibt in graphischer Form das Verhalten der Leberenzyme bis zur 4. postoperativen Woche wieder. Es sind jeweils die Mittelwerte angegeben. Den angegebenen Mittelwerten liegen jeweils unterschiedliche Anzahl von Werten zugrunde ($n = 3 - 12$).

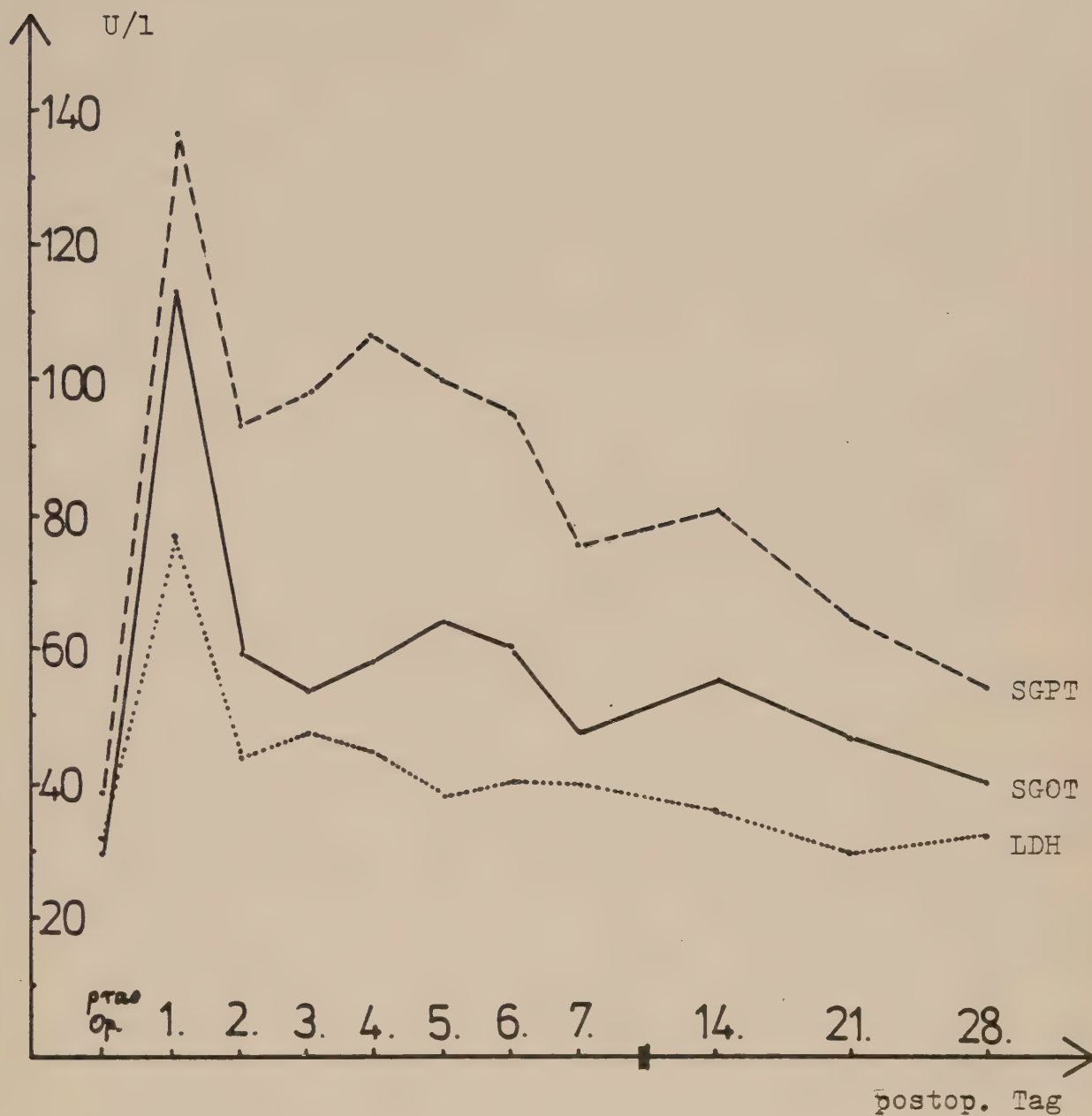


Abb. 26 Verhalten der Leberenzyme bis zur 4. Woche nach der Transplantation

4. Autotransplantation

Bei 18 Hunden wurde nach Pankreatektomie und Aufarbeitung des Pankreas die Autotransplantation in die Leber über die Pfortader durchgeführt. Während der Transplantation kam es zu keinem Zwischenfall, insbesondere blieben die Kreislaufverhältnisse stabil. Da 4 von den Tieren dieser Gruppe an postoperativen Komplikationen starben, die nicht mit der Transplantation in Zusammenhang standen, beruhen die Daten auf 14 ausgewerteten Versuchstieren.

Ein Erfolg der Transplantation ließ sich bereits postoperativ und am ersten postoperativen Tag mit der Blutzuckerbestimmung abschätzen, da die erfolgreich transplantierten Tiere bereits jetzt Blutzuckerwerte unter 170 mg % aufwiesen. Blutzuckerwerte über 200 mg % am ersten postoperativen Tag ließen bereits einen weniger erfolgreichen Verlauf erwarten.

a. Laborparameter

Von allen Tieren wurde an den ersten 7 postoperativen Tagen täglich der Blutzuckerspiegel im Nüchternzustand kontrolliert. 1 Woche nach der Transplantation erfolgten die Blutzuckerkontrollen in größeren Abständen. Die Mittelwerte mit den Standardabweichungen der Blutzuckerspiegel nach Autotransplantation sind in der Abbildung 27 im Vergleich zu den Blutzuckerspiegeln der Kontrolltiere dargestellt. Nach Absinken auf ein fast normoglykämisches Niveau bei einigen Tieren ist dann im Verlauf mehrerer Wochen wieder ein leichter Anstieg der Blutzuckerspiegel festzustellen. Die im Vergleich hierzu herangezogenen Blutzuckerspiegel der Kontrolltiere ergeben jedoch für alle postoperativen Tage signifikant höhere Werte.

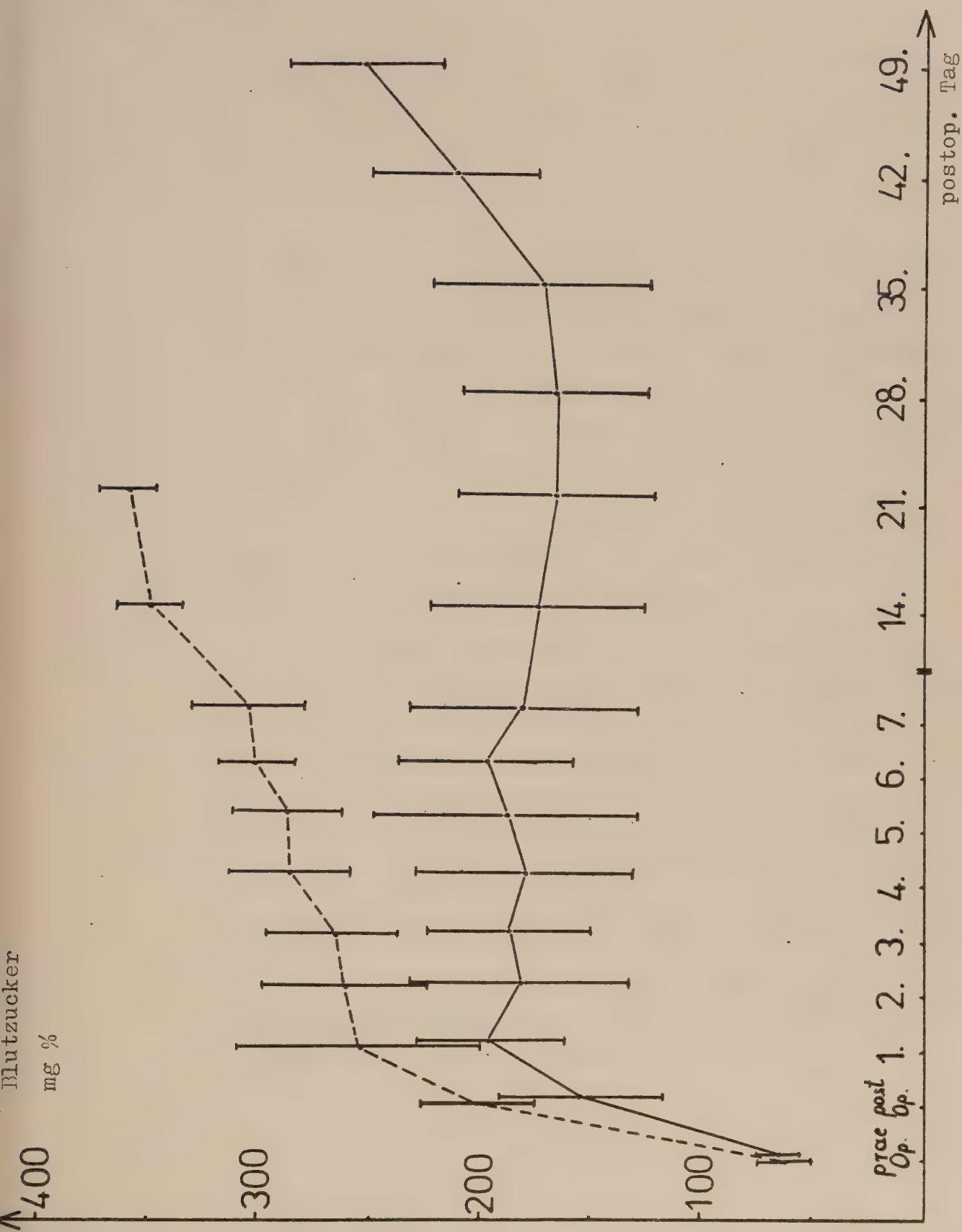


Abb. 27 Mittelwerte $\pm$ SE der Nüchternblutzuckerspiegel von 14 Hunden nach Autotransplantation (—) im Vergleich zu den Kontrolltieren (-----)

6 Tiere wurden nach Autotransplantation normoglykämisch mit Nüchternblutzuckerspiegeln unter 150 mg %. Bei 4 weiteren Tieren lagen die Nüchternblutzuckerspiegel zwischen 150 und 250 mg % und 4 Tiere zeigten mit Nüchternwerten über 250 mg % wenig Effekt.

Bei den 14 Tieren nach Autotransplantation, die die postoperative Phase überlebten, betrug die Überlebenszeit 22 bis über 120 Tage. Die durchschnittliche Überlebenszeit lag bei 58,3 Tagen, wobei mitbeachtet werden muß, daß bei 2 Tieren nach 6 Monaten trotz relativ guter Konstitution der Versuch beendet wurde, und daß bei einigen Tieren wegen Kachexie der Versuch vorzeitig beendet wurde. Bei langer Überlebenszeit setzt sich die Beobachtung fort, daß mit der Versuchsdauer ein langsam fortschreitender Funktionsverlust mit ansteigenden Blutzuckerwerten eintritt.

In gleichen Abständen wie die Blutzuckerbestimmungen durchgeführt wurden, erfolgten auch die Bestimmungen der Insulinspiegel im Serum. Die Abbildung 28 zeigt die Insulinspiegel nach Autotransplantation im Vergleich zu den apankreatischen Kontrolltieren. Es ergibt sich auch bei den normoglykämischen Tieren eine deutliche Reduzierung der Insulinspiegel gegenüber Normalwerten. Bereits ab dem 1. postoperativen Tag sind die Insulinspiegel gegenüber den Werten der Kontrolltiere signifikant erhöht.

Analog dem Verlauf der Blutzuckerspiegel ist mit der Dauer des Versuches auch eine abfallende Tendenz der Insulinspiegel festzustellen.

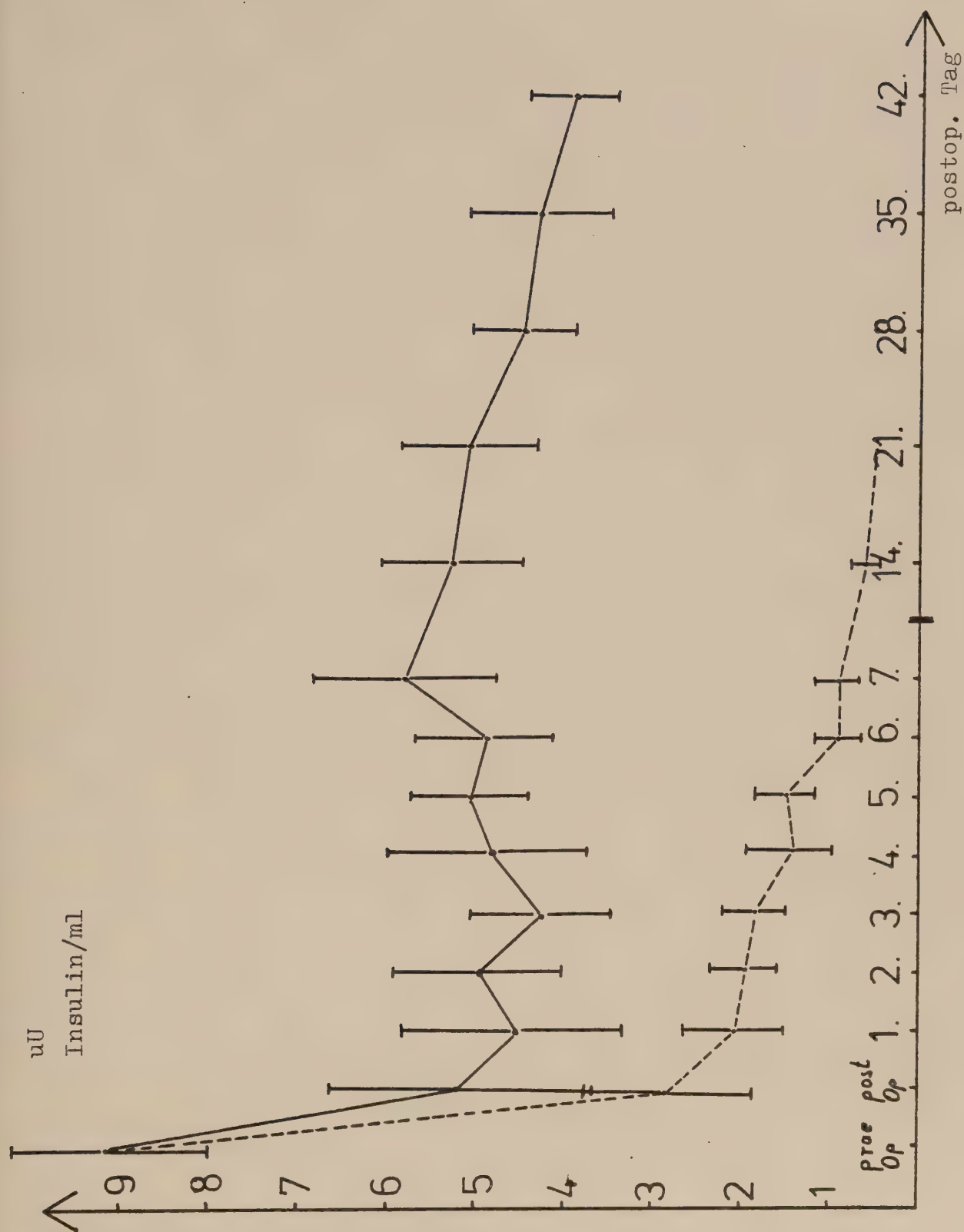


Abb. 28 Mittelwerte + SE der Insulinspiegel nach Autotransplantation (—) im Vergleich zu den pankreatektomierten Kontrolltieren (-----)

Ein Tier wurde bei der Darstellung der Insulinkurven nicht berücksichtigt, da sich infolge extrem hoher Insulinwerte ein nicht repräsentativer Verlauf ergeben hätte. Bei diesem Beagle zeigten sich nach Pankreatektomie und Autotransplantation in den ersten 3 postoperativen Wochen Blutzuckerwerte zwischen 130 und 210 mg %. Danach ergab sich ein Anstieg bis 380 mg %, zwischenzeitlich unerklärt ein Abfall bis 100 mg %. Die nach der 4. Woche gemessenen extrem hohen Insulinwerte korrelieren jedoch in keiner Weise mit den Blutzuckerwerten. Das Tier verstarb am 111. postoperativen Tag hyperglykämisch. Die letzten bei Hyperglykämie gemessenen Insulinspiegel lagen zwischen 393 und 580 uU Insulin. Ein Glukosebelastungstest bei diesem Tier ergab einen Blutzuckeranstieg bis 600 mg %, gefolgt von einem sehr verzögerten Abfall. Während des Belastungstestes blieben die Insulinspiegel relativ starr bei 400 uU Insulin/ml.

Bei den weitgehend normoglykämischen Tieren nach Autotransplantation wurde 10 - 18 Tage postoperativ ein Glukosebelastungstest durchgeführt. Dazu wurden die nüchternen Tiere mit Combelen i.m. sediert und anschließend 0,5 g Glukose/kg KG i.V. appliziert. Die ermittelten Blutzuckerspiegel bis 120 Minuten nach Glukoseinjektion sind in der Abbildung 29 dargestellt. Im Vergleich zu gesunden Hunden zeigte sich ein deutlich höherer Anstieg nach der Belastung und ein verzögerter Abfall.

Der entsprechende Verlauf der Seruminsulinspiegel nach Glukosebelastung ist in der Abbildung 30 dargestellt. Während des Testverlaufes ist nur ein geringfügiger und verzögerter Insulinanstieg festzustellen.

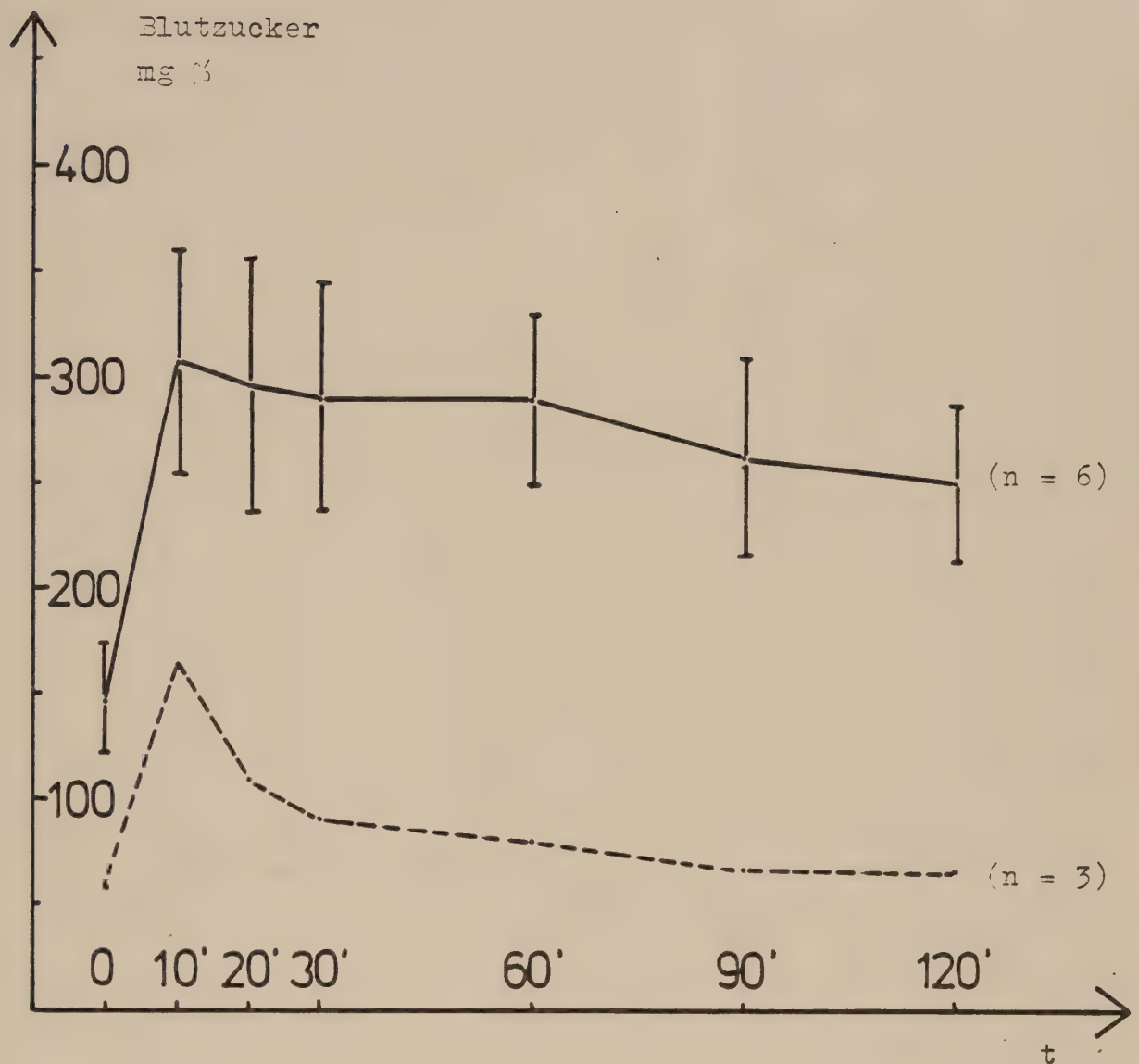


Abb. 29 Verlauf der Blutzuckerspiegel nach Autotransplantation (—) im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren (-----) bei Belastung mit 0,5 g Glukose/kg KG i.V.

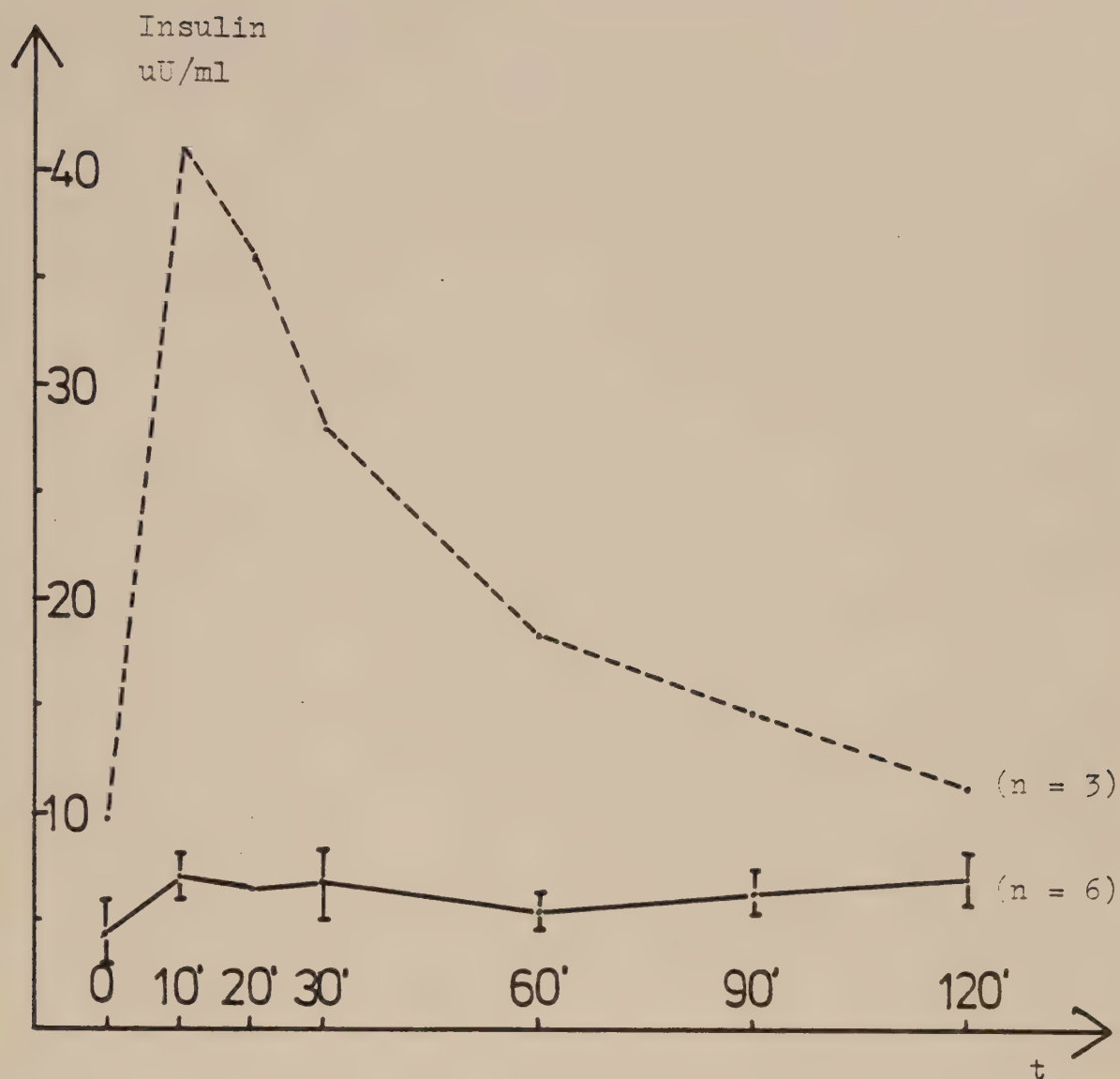


Abb. 30 Zu Abb. 29 entsprechender Verlauf der Seruminsulin-
spiegel beim Glukosebelastungstest

Bei 5 weitgehend normoglykämischen Tieren wurde 10 bis 28 Tage nach der Autotransplantation ein Tolbutamid-Test durchgeführt. Nach Sedierung wurde den nüchternen Tieren 25 mg Rastinon^R/kg KG intravenös injiziert und nach 10 bis 120 Minuten der Blutzucker bestimmt.

Die Abbildung 31 zeigt die Veränderungen der Blutzuckerspiegel in % vom Ausgangswert vor der Rastinongabe. Hierbei ergibt sich ein divergierender Verlauf bei den einzelnen Tieren und überraschenderweise auch in 2 Fällen ein Blutzuckeranstieg nach Tolbutamidinjektion. Mehrere Stunden nach dem Tolbutamidtest trat bei einem Tier eine Hypoglykämie mit komatösem Zustand und erforderlicher Glukoseinfusion auf. Danach wurde das Tier wieder munter, wurde jedoch am nächsten morgen wieder im Koma gefunden, und eine weitere Glukoseinfusion mußte erfolgen.

Während des Tolbutamid-Testes wurden auch die entsprechenden Insulinspiegel bestimmt. Es ergaben sich jedoch keine wesentlichen Veränderungen gegenüber dem Ausgangswert. Der Anstieg des Insulinspiegels infolge der Tolbutamidinjektion war in allen Fällen als geringfügig anzusehen. Bei einem Tier mit hypoglykämischer Phase wurde ein maximaler Anstieg bis 7 uU Insulin/ml mehrere Stunden nach Testbeginn gemessen.

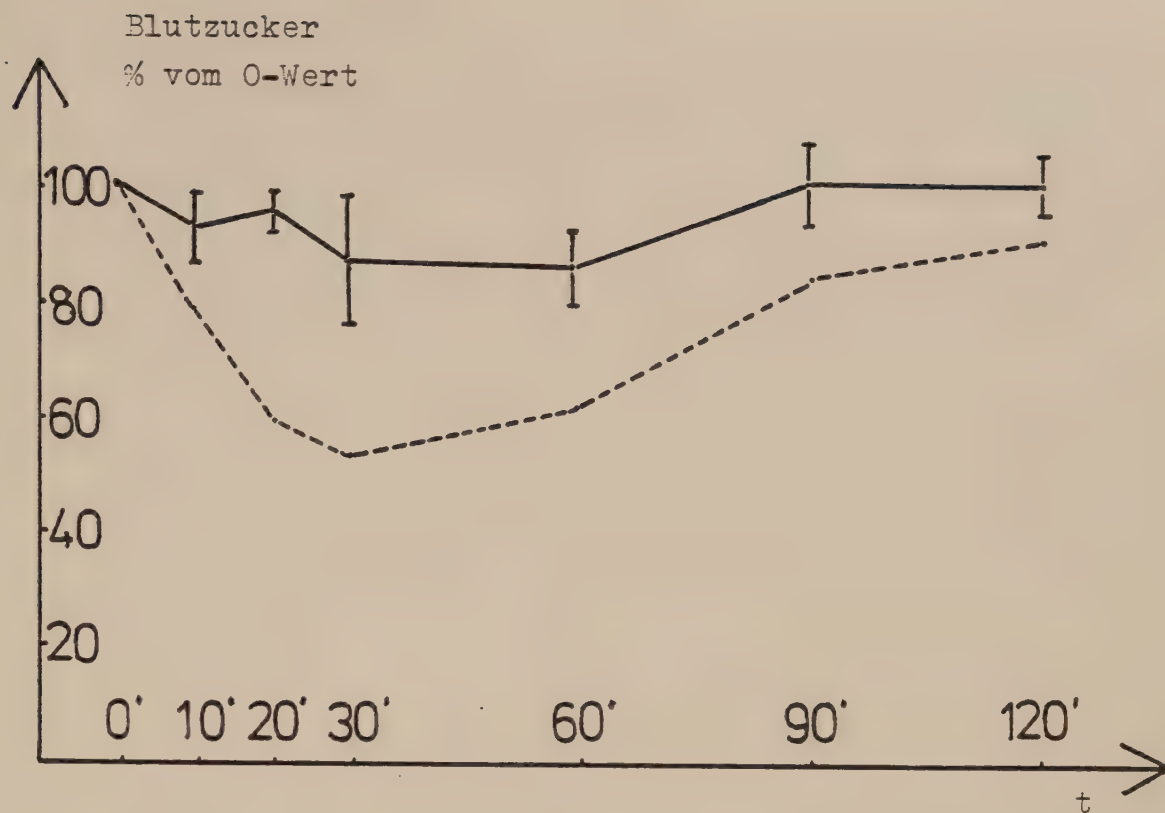


Abb. 31 Tolbutamid-Test bei 5 Hunden nach Autotransplantation (—) im Vergleich zu 2 gesunden Kontrolltieren. Die Blutzuckerwerte sind in % vom Ausgangswert vor Injektion von 25 mg Rastinon/kg KG angegeben

b. Leberhistologie

Infolge der exokrinen Insuffizienz nach Pankreatektomie und teilweise auch durch die diabetische Stoffwechsellaage mußte nach 36 bis 150 Tagen jeweils der Versuch abgeschlossen werden. Auch die beschriebene Behandlung mit Enzymsubstitution und hochkalorischer Fütterung konnte die kontinuierliche Gewichtsabnahme nicht verhindern.

Bei Versuchsabschluß wurden die Tiere laparotomiert. Nach Messung des Pfortaderdruckes und Portographie wurde zur optimalen histologischen Aufarbeitung die Leber vital über einen Katheter in der Pfortader mit Bouin'scher Lösung perfundiert und fixiert.

Die Abbildung 32 zeigt zunächst Gewebe eines Tieres, welches 4 Tage nach Pankreatektomie und Autotransplantation infolge Pneumonie verstarb. Hier liegt eine intakte Insel reaktionslos in einer Portalvene. Ebenso findet man auch exokrines Material in den Gefäßlumina (Abb. 33). Das exokrine Material ist bei der HE-Färbung durch die deutlich basophile Anfärbung des Zytoplasmas zu erkennen. Die Aufarbeitung des Lebergewebes 6 Wochen bis über 5 Monate nach der Transplantation sollte dann Aufschluß darüber geben, wie das transplantierte Gewebe eventuell eine Veränderung erfährt, und welche Veränderungen vom Transplantationsort ausgehen.

Zunächst war zu beobachten, daß bei der Durchmusterung der Leberpräparate von Tieren, die an postoperativen Komplikationen früh verstarben, Inselgewebe an vielen Schnitten ohne Mühe auffindbar war, während bei Versuchsabschluß nach über 6 Wochen Versuchsdauer die Inseln vergleichsweise spärlich in den Präparaten vorkamen. Sehr häufig fanden sich thrombotische Auflagerungen und später fibrotische Umbauvorgänge an den Transplantaten.

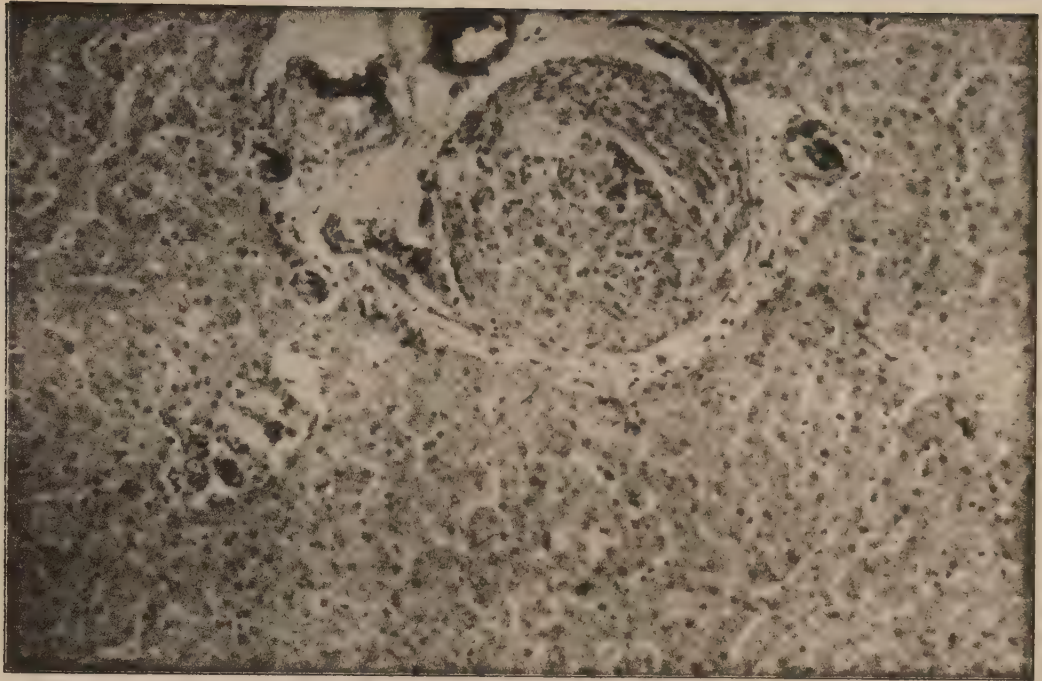


Abb. 32 Intakte Langerhans'sche Insel 4 Tage nach Autotransplantation reaktionslos in einer Lebervene (HE-Färbung, 100-fach)

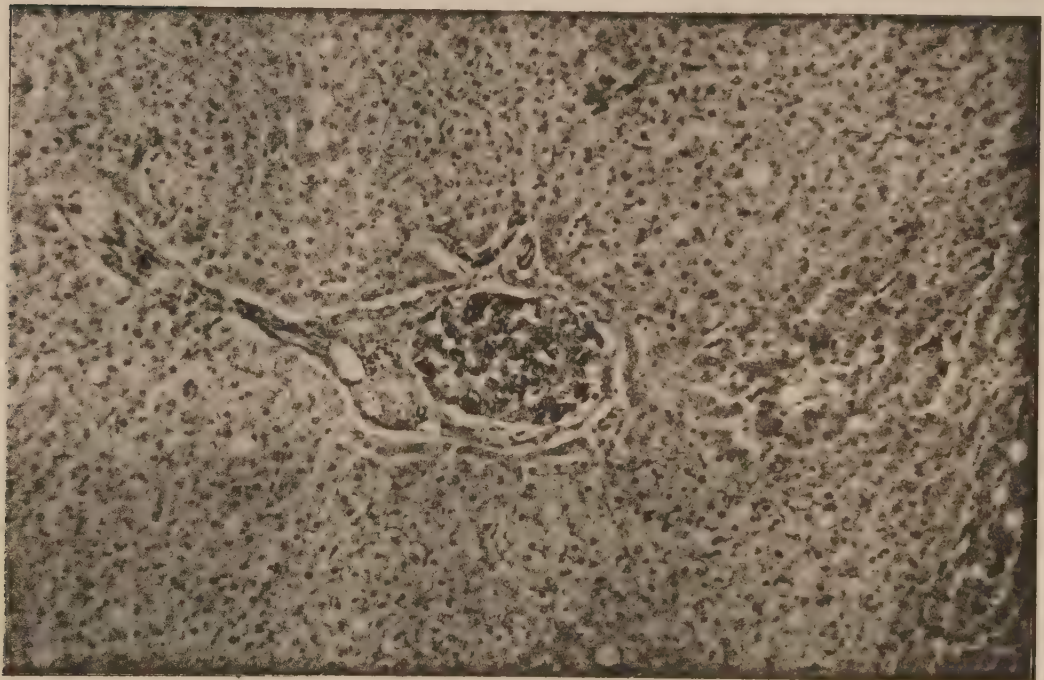


Abb. 33 Embolus von exokrinen Zellen beim gleichen Tier wie Abb. 32 (HE-Färbung, 100-fach)

Die Abbildung 34 zeigt bei einem Tier nach 8 Wochen Versuchsdauer 2 Inseln mit thrombotischem Material und Kernresten als Zeichen eines lytischen Zellunterganges. Bei diesem Tier bestand nach Autotransplantation über 4 Wochen weitgehend Normoglykämie, wonach die Blutzuckerwerte dann allmählich bis über 300 mg % anstiegen. Die Abbildung 35 zeigt vom gleichen Tier vitale exokrine Anteile mit Kapillarisierung in der Portalvene. Dazu findet sich eine wabige Auflockerung der Leberzellen in der Umgebung exokriner Emboli als Zeichen von örtlichen Zirkulationsstörungen oder degenerativer Veränderungen infolge direkter enzymatischer Auswirkung der exokrinen Zellen.

Durch die Organisationsvorgänge an den umgebenden thrombotischen Auflagerungen und an den Inseln selbst kommt es zu Kapillarisierung. Die Abbildung 36 zeigt Kapillaren zwischen den transplantierten Inselzellen.

Die Periportalfelder werden mit zunehmender Versuchsdauer stärker mit Bindegewebe durchsetzt und in einzelnen Lebervenen finden sich später nur noch kollagene Narben nach Organisation von Thromben und wahrscheinlich auch vollständiger Organisation von Inselzellen (Abb. 37).

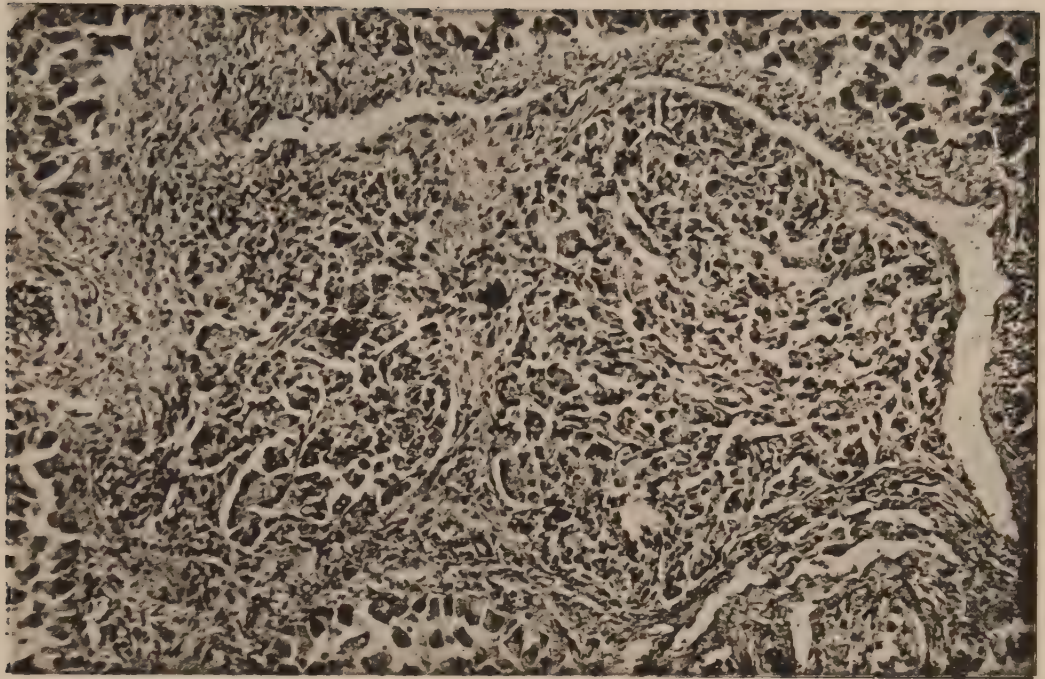


Abb. 34 2 Inseln mit thrombotischem Material 8 Wochen nach Autotransplantation (HE-Färbung, 100-fach)

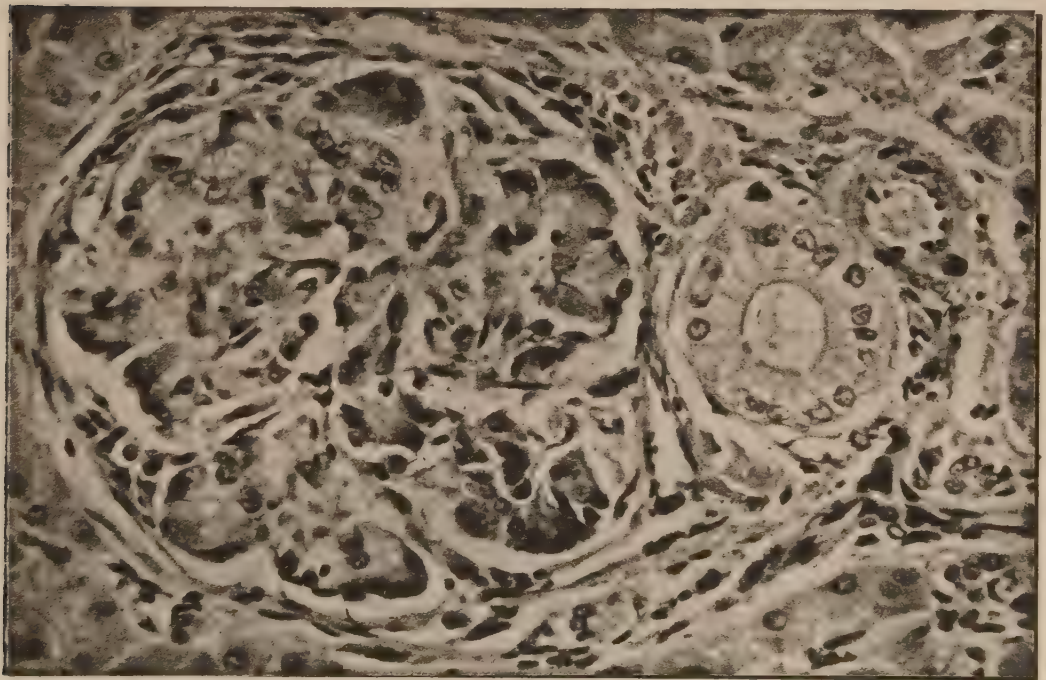


Abb. 35 Vitale exokrine Anteile 8 Wochen nach Autotransplantation (HE-Färbung, 250-fach)

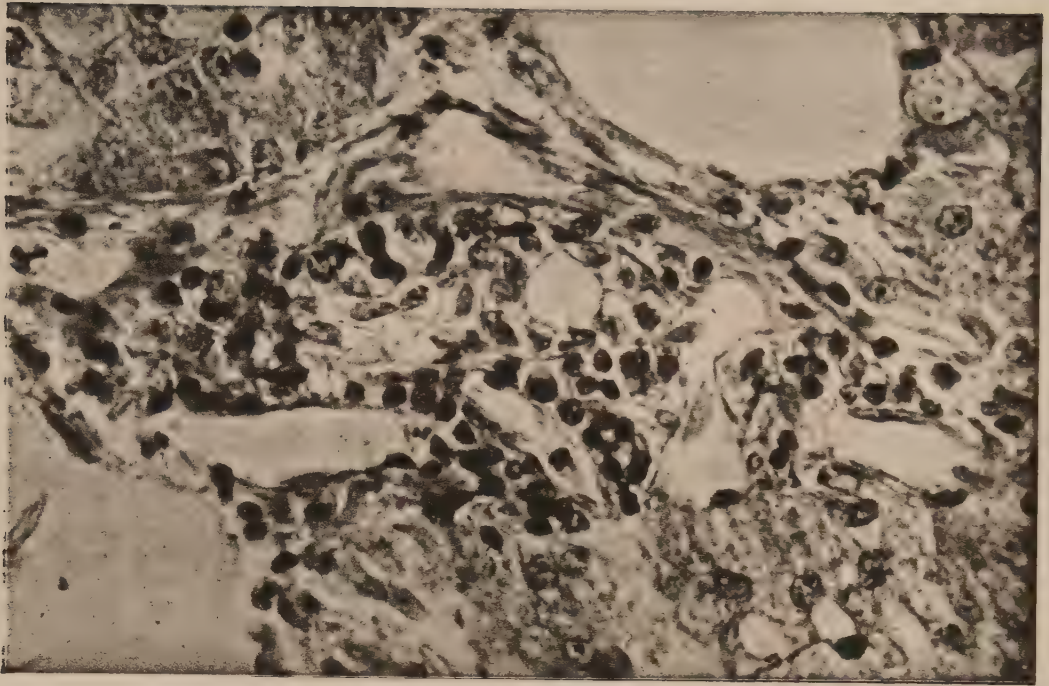


Abb. 36 Inselrest mit Kapillarisierung als Zeichen der Organisation 6 Wochen nach Autotransplantation (HE-Färbung, 250-fach)

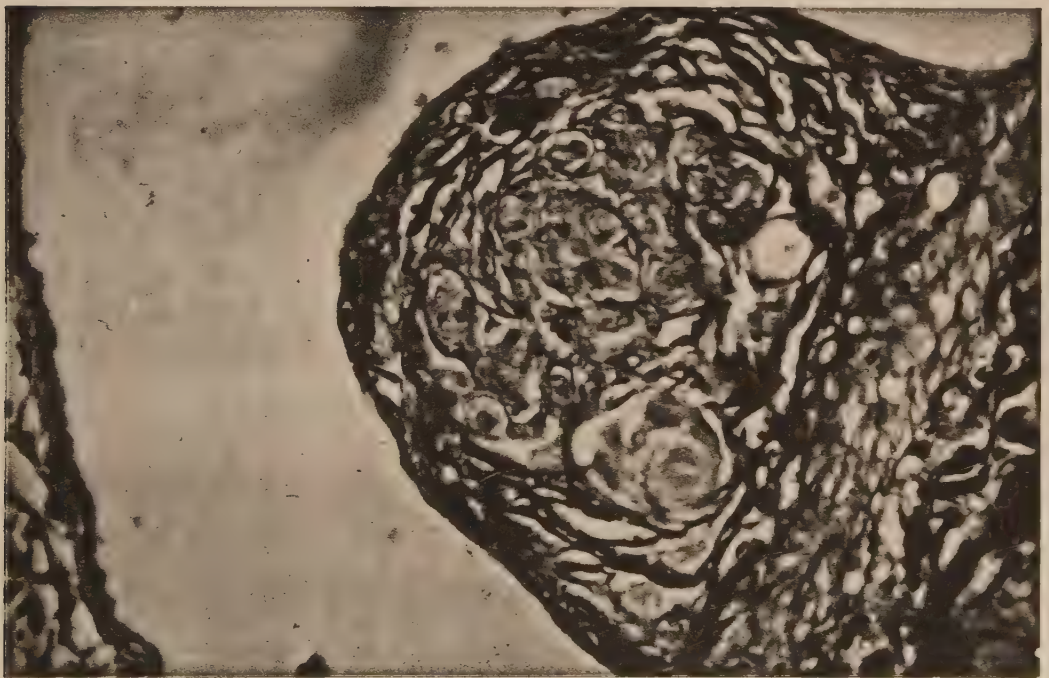


Abb. 37 Wandständiges, weitgehend organisiertes Transplantat mit fortgeschrittener Fibrosierung und kaum noch erkennbaren Inselresten nach einer Versuchsdauer von 4 Monaten (Elastica v. Gieson-Färbung, 250-fach)

5. Allotransplantation

Bei 10 Hunden wurde nach Pankreatektomie eine Inselallotransplantation vorgenommen. 2 Tiere dieser Gruppe verstarben an postoperativen Komplikationen, so daß die Auswertung auf den Daten von 8 Tieren beruht. Komplikationen durch die Transplantation selbst traten nicht auf.

Die Überlebenszeit der Tiere reichte von 17 bis 77 Tage bei einer mittleren Überlebenszeit von 31,5 Tagen. Damit ergibt sich eine Verlängerung der Überlebenszeit nach Allotransplantation um 14,3 Tage gegenüber den nur pankreatektomierten Kontrolltieren.

a. Laborparameter

Entsprechend den Tieren in der Gruppe nach Autotransplantation wurden prae- und postoperativ, täglich in der ersten postoperativen Woche sowie anschließend wöchentlich der Blutzucker und die Insulinspiegel bestimmt. In der Abbildung 38 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Blutzuckerspiegel dargestellt, und die Abbildung 39 zeigt zu den gleichen Daten die Werte der Insulinspiegel. Während beim Vergleich der Blutzuckerspiegel mit den Kontrolltieren eine signifikante Erniedrigung nach Allotransplantation nur vom 1. bis 7. postoperativen Tag festzustellen ist, sind die Insulinspiegel nur vom 1. bis 5. postoperativen Tag gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöht.

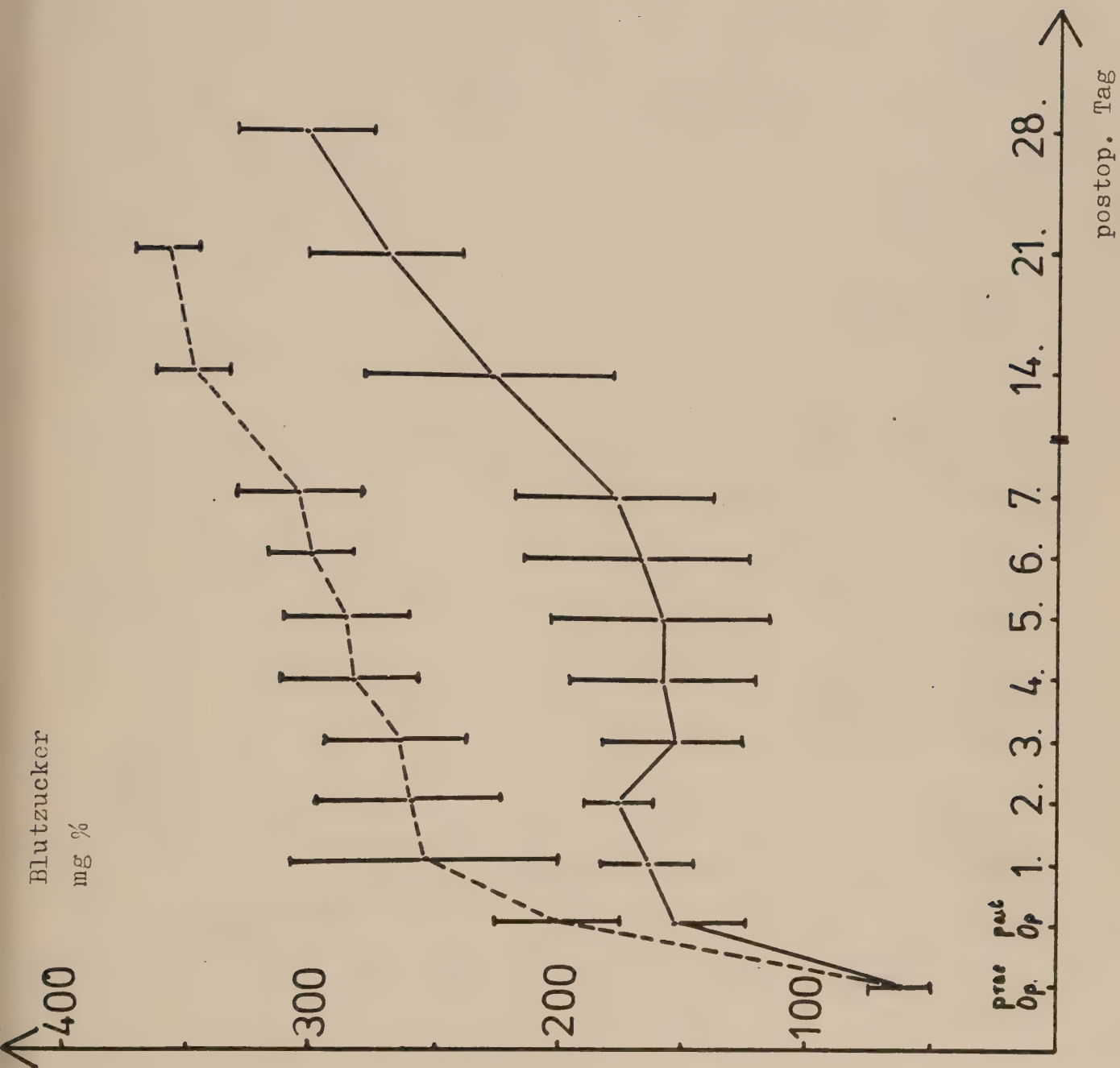


Abb. 38 Mittelwerte $\pm$ SE der Blutzuckerspiegel nach Inselalлотransplantation (—) und Blutzuckerspiegel der Kontrolltiere (-----)

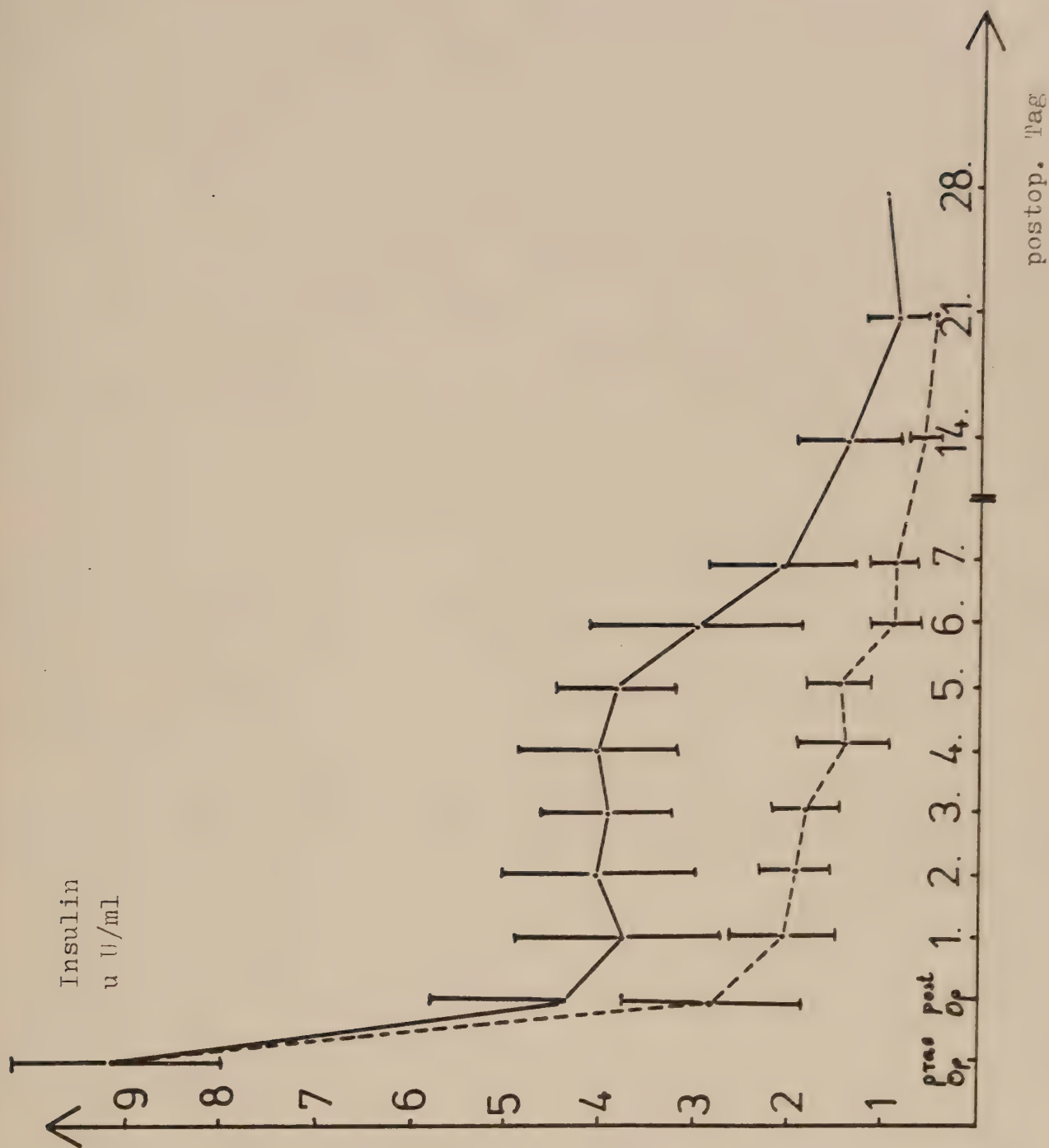


Abb. 39 Mittelwerte $\pm$ SE der Insulinspiegel nach Allotransplantation (—) im Vergleich zu den Kontrolltieren (-----)

Nach Allotransplantation erfolgte bei 2 Tieren in der normoglykämischen Phase am 7. bzw. 9. postoperativen Tag ein Glukosebelastungstest mit 0,5 g Glukose/kg KG intravenös. Hierbei zeigte sich ein rascher Anstieg des Blutzuckers bis über 300 mg % mit einem verzögerten Abfall, wobei auch nach 120 Minuten der Blutzucker noch auf 240 bzw. 270 mg % erhöht war.

Die Abbildung 40 zeigt den Verlauf der Blutzuckerspiegel beim Glukosebelastungstest. Die entsprechenden Insulinspiegel ergaben ebenfalls wie nach Autotransplantation keine nennenswerte Erhöhung durch die Glukosebelastung im Sinne einer Sekretionsstarre.

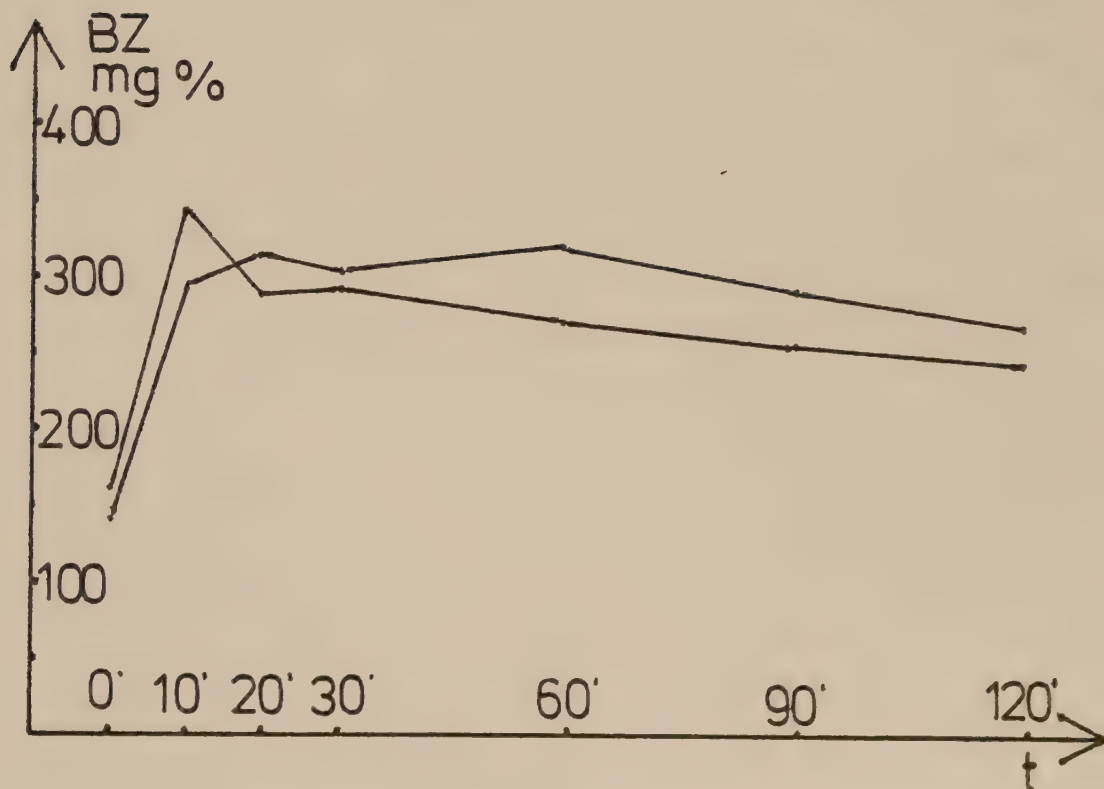


Abb. 40 Glukosebelastungstest mit 0,5 g Glukose/kg KG i.V. nach Inselallotransplantation

b. Leberhistologie

Nach 17 bis 77 Tagen wurde bei den pankreatektomierten Tieren mit Allotransplantaten der Versuch infolge präfinaler Zustände, bedingt durch exokrine Insuffizienz und diabetische Stoffwechsellaage, beendet. Wie in der Gruppe nach Autotransplantation erfolgte der Abschluß durch eine Laparotomie mit Messung des Pfortaderdruckes und Perfusion der Leber mit Bouin'scher Lösung über das Pfortadersystem zur Gewebefixierung. Eine wesentliche Erhöhung des Pfortaderdruckes wurde nicht gemessen.

Die histologische Aufarbeitung konnte oft nur noch spärliche Inselanteile nachweisen, wobei bereits zum Zeitpunkt der ersten Kontrolle nach 7 Tagen massive lymphozytäre Infiltrate zu beobachten waren (Abb. 41). Im weiteren Verlauf nehmen die Infiltrate zu, oft mit Infiltration des gesamten Portalfeldes. Intakte transplantierte Zellen sind hier nur noch schwer zu identifizieren (Abb. 42). Fallweise fanden sich nekrotische Inselreste mit kollagener Faserbildung, umgeben von einem hyalinen Nekrosesaum mit bandförmigen lymphozytären Infiltraten (Abb. 43). Nach einem Verlauf von 4 Wochen waren Inselzellen nur noch schwer nachweisbar, es fanden sich vermehrt lymphozytenreiche Herde und fleckförmige dichte lymphozytäre Infiltrate in den Portalfeldern. Neben Lymphozyten zeigten sich in den Venen auch fibrinoide Nekrosen, die in ihren Lichtungen teilweise schattenhaft erkennbare Kollagenfasern als Hinweis auf zugrundegegangenes Inselgewebe enthielten. Die Abbildung 44 zeigt einen wandständigen Inselrest mit lymphozytären Infiltraten nach einer Versuchsdauer von 77 Tagen.

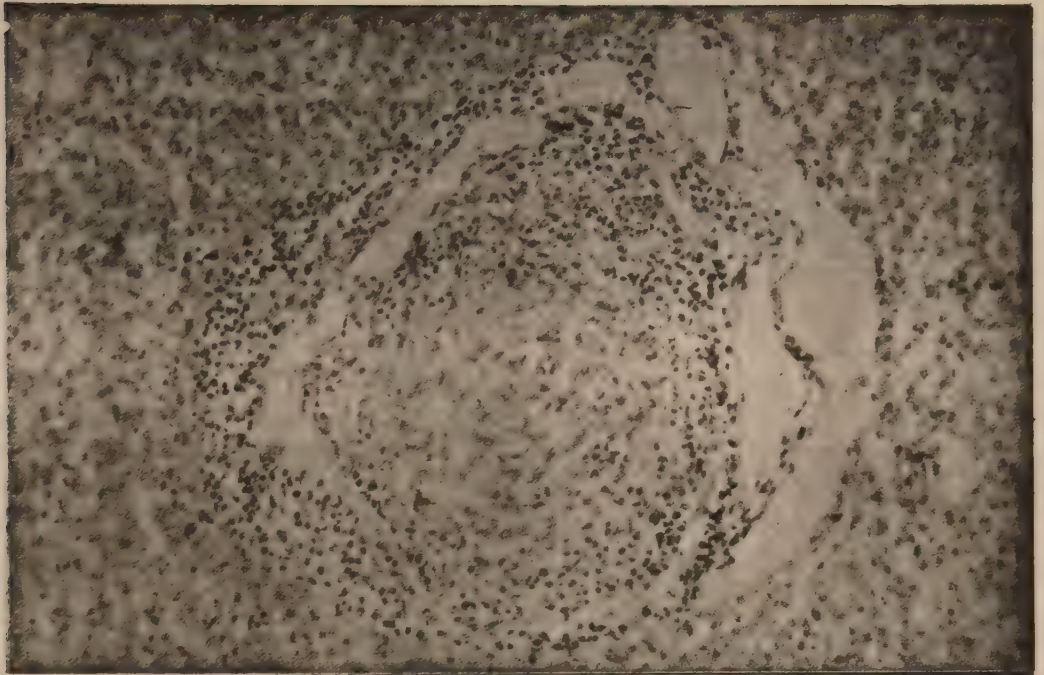


Abb. 41 Insel mit massiver lymphozytärer Infiltration
7 Tage nach Allotransplantation (HE-Färbung,
250-fach)

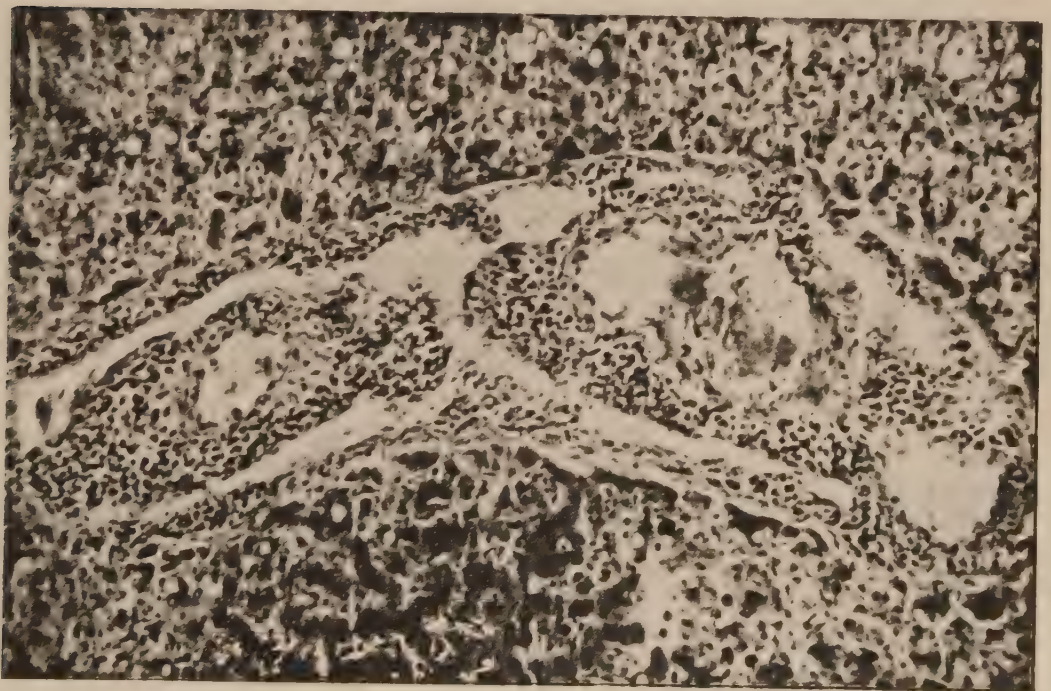


Abb. 42 Lymphozytäre Infiltration des gesamten Portal-
feldes 17 Tage nach Allotransplantation
(HE-Färbung, 100-fach)

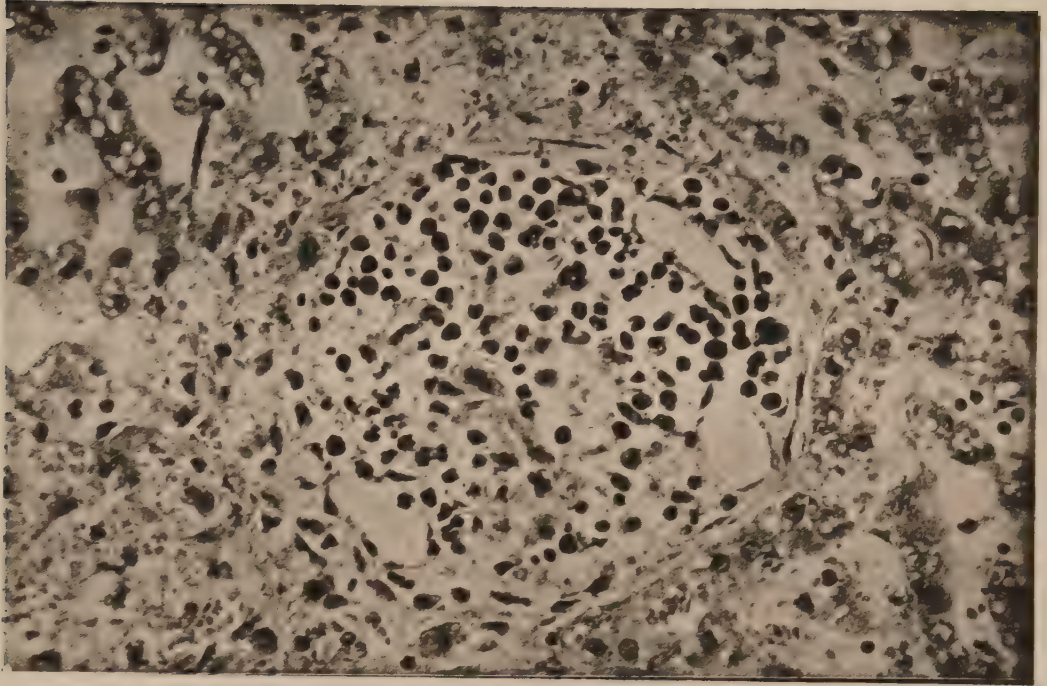


Abb. 43 Inselrest mit lymphozytärer Infiltration und Makrophagen sowie kollagener Faserbildung 4 Wochen nach Allotransplantation (HE-Färbung, 250-fach)

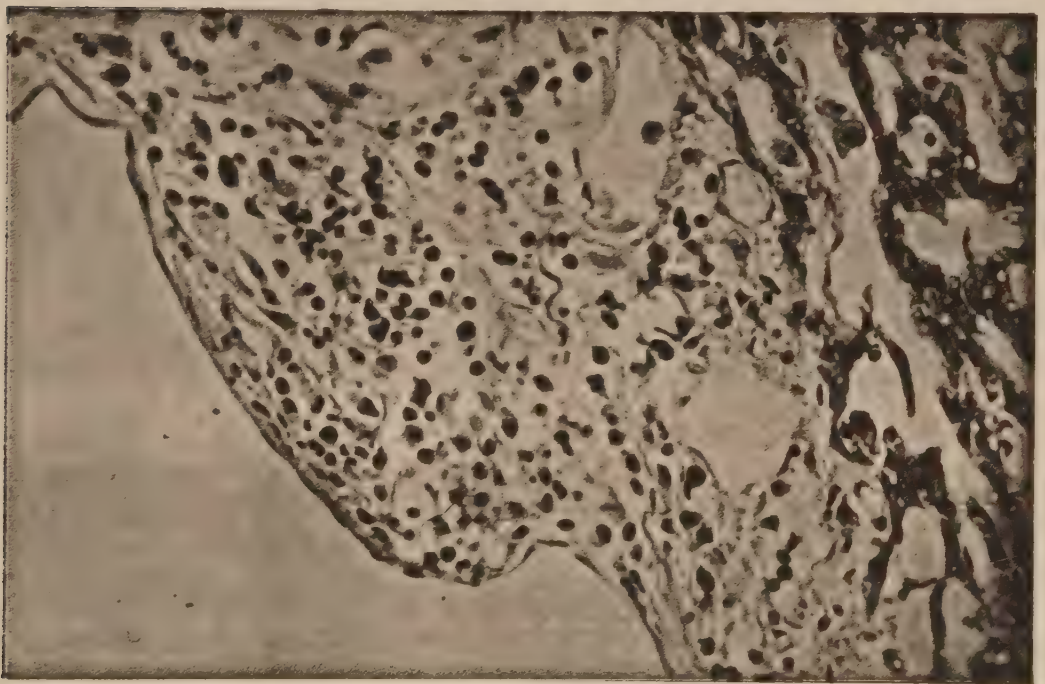


Abb. 44 Wandständiger Inselrest mit lymphozytärer Infiltration 77 Tage nach der Allotransplantation (HE-Färbung, 250-fach)

VII. Diskussion

Die Transplantation isolierter Pankreasinseln muß als Alternativverfahren zur Transplantation des Pankreasorganes mit vaskulärem Anschluß gesehen werden. Beide Verfahren haben bei der bisherigen klinischen Anwendung enttäuscht - einerseits betreffend eine hohe Komplikationsrate (55), andererseits bezüglich unzureichende Funktion (52). Ein Nachteil der Inseltransplantation ist die unzureichende Ausbeute an Inseln bei den Isolationsverfahren. Die relative Ungefährlichkeit der transplantation isolierter Inseln gab Anlaß zu unserem Versuch, diese Trennmethodik zu verbessern, und damit auch eine günstigere Funktion zu erreichen.

Die Möglichkeit der Autotransplantation der Inseln nach Duodeno-pankreatektomie wegen chronischer Pankreatitis gibt einen zusätzlichen Indikationsbereich, ohne daß immunologische Probleme auftreten. Der Erfolg scheint hier in hohem Maße von der Trennmethode abhängig.

Entgegen anfänglichen Vermutungen hat sich herausgestellt, daß isolierte Inseln immunologisch sehr empfindlich reagieren (10). Von vielen Untersuchern wurde diese Beobachtung bestätigt, und es darf als besonderes Problem angesehen werden, welche Methoden der Immunsuppression hier wirksam eingesetzt werden können. Die Problematik der Immunsuppression wurde bei der vorliegenden Untersuchungsserie ausgeklammert.

1. Diabetesmodell

Ein sicheres Diabetesmodell höherer Tiere kann durch die vollständige Entfernung des Pankreas erstellt werden. Nachteil dieses Diabetesmodells ist der hohe operative Aufwand, die Sterblichkeit der Tiere infolge des Eingriffs und die nachfolgende exokrine Insuffizienz. Die Schwierigkeiten beim Hund im Hinblick auf postoperative Gefährdung nach Duodeno-pankreatektomie sind bekannt (4, 8, 97). Bei Entfernung der Drüse unter Schonung der A. pankreatico-duodenalis wird das Duodenum belassen und die postoperative Sterblichkeit konnte bei unseren Versuchen von etwa 50 % auf 20 % gesenkt werden.

Die negativen Folgen der exokrinen Insuffizienz mußten wir jedoch bei allen Tieren in Form eintretender Kachexie trotz Enzymsubstitution feststellen. Dabei läßt sich aber nicht genau abgrenzen, inwieweit diese Kachexie durch die diabetische Stoffwechsellage bedingt oder mitbedingt war.

Bei Belassung des Duodenums besteht die Möglichkeit, daß entlang der A. pankreatico-duodenalis Inselgewebe zurückbleibt. Daher haben wir eine Gruppe von Kontrolltieren nach Duodeno-pankreatektomie den Tieren mit Pankreatektomie nach Markowitz gegenübergestellt. Die Hyperglykämie trat in beiden Gruppen sofort und in gleichem Ausmaß ein. Geringe Insulinspiegel ließen sich jedoch bei allen Tieren nachweisen, so daß eine Sekretion von Insulinspuren durch extrapankreatisches Gewebe angenommen werden muß (97, 98). Die mittlere Überlebenszeit nach Pankreatektomie war mit 17,2 Tagen gegenüber 13,4 Tagen nach Duodeno-pankreatektomie erhöht. Bergan (4) erreichte nach Pankreatektomie eine maximale Überlebenszeit von 11 Tagen, wobei von 26 Tieren 18 die Operation überlebten.

Das Modell der diabetischen Ratte scheint für die Humanmedizin begrenzte Bedeutung zu haben, denn die hier erreichten Erfolge konnten bei höheren Tieren und beim Menschen nicht erzielt werden. Chick (14) berichtet über erfolgreiche Allotransplantationen bei diabetischen Ratten unter Verwendung semipermeabler Kammern mit kultivierten Inseln, die in einen AV-Shunt eingebracht werden. Ähnlich berichtet Tze (120) über erfolgreiche Allo- und Xenotransplantationen bei Ratten.

Das Modell des Streptozotocin-induzierten Diabetes wurde bei unseren Untersuchungen bewußt nicht gewählt, da durch diese toxische Substanz auch Schädigungen der Leber und Niere möglich sind, und da durch zu niedrige Dosierung Inselgewebe funktionstüchtig bleiben kann. Einige Untersucher fanden bei nur mit Streptozotocin behandelten Versuchstieren Leberzysten und Nierentumoren (115). Zur Diabetesinduktion werden unterschiedliche Dosierungen angegeben, meist wird bei Ratten eine Dosis von 35 - 65 mg/kg KG verwendet (5, 21, 32). Beim Alloxan- oder Streptozotocin-induzierten Diabetes muß eine spontane Regeneration von B-Zellen beachtet werden (130). Diese Regeneration von B-Zellen kann auch nach mehreren Monaten eintreten.

Lorenz (58) verwendet ein Diabetesmodell des Hundes mit subtotaler Pankreatektomie und 2-maliger Injektion von 25 mg/kg KG Streptozotocin. Die Überlebenszeit seiner Kontrolltiere ist mit 30 Tagen etwa doppelt so hoch wie bei unseren Kontrolltieren. Kretschmer (44) gibt nach Pankreatektomie eine Überlebenszeit von 7 Tagen (2 - 15 Tage) an, wobei sicher postoperative Komplikationen miteingehen.

2. Inselisolierung

Die Isolierung einer ausreichenden Zahl von intakten Inseln aus dem Pankreas höherer Säugetiere und dem menschlichen Pankreas ist trotz umfangreicher experimenteller Untersuchungen ein zentrales Problem der Inseltransplantation geblieben (30, 61, 73, 104). Durch enzymatische Andauung mit Kollagenase werden die Inseln aus dem Gewebeverband gelöst, gleichzeitig kommt es infolge unterschiedlicher Einwirkdauer auf unterschiedlich große Organpartikel auch zu Schädigungen von Inselzellen (2, 19). Bei Inkubationszeiten über 15 Minuten beobachtete Hahn (29) Alterationen mit Membraneinrissen, Degranulierungen und Erweiterung des Retikulums. Die eigenen histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen zwar je nach mechanischer Traumatisierung vermehrt Zelltrümmer, jedoch erscheinen die B-Zellen im Transplantat intakt.

Die Trennung exokriner und endokriner Elemente kann dann als nächster Schritt durch die Fikoll-Gradiententechnik erfolgen, womit jedoch durch hochmolekulares Fikoll ein weiterer schädigender Einfluß auf das Inselgewebe verbunden ist (56). Die Effektivität dieser Trennmethode ist mit 5 - 10 % (64, 112) unbefriedigend. Jonasson (34) erreichte durch Digestion und Auswaschen eine Ausbeute von 10 - 30 % ohne genaue Angabe der exokrinen Verunreinigung. Aus dem mehr fibrösen Pankreas des Affen lösten sich infolge längerer Inkubation mit Kollagenase auch einzelne Inselzellen, die sich wieder zu Pseudoinseln zusammenlagerten. Andersson (2) erhielt bei der Isolation von Inseln aus Pankreata älterer Patienten eine minimale Ausbeute infolge Organfibrose und Verfettung.

Um den Schritt der Fikoll-Schichtentrennung auszuschalten, haben wir ein Verfahren reiner Filtrierung gewählt. In abgewandelter Form wurde auch von anderen Autoren bereits ein Verfahren der Filtertrennung beschrieben (89, 102, 107). Der erreichte Reinheitsgrad war bei diesen Untersuchungen jedoch nicht ausreichend, so daß noch ein dritter Schritt zur Isolierung, teils wieder in Form der Fikoll-Schichtentrennung, unternommen werden mußte. Kolb (39) verwendete einen Filter mit 300 μ m Porenweite zur Filtrierung bereits angedauten Gewebes in mehreren Schritten.

Die Vorbereitung des Gewebes erfolgte mit retrograder Distension des Organes über den Pankreasgang. Zur Gewebekomogenisierung mußte auf das einfache Zerteilen mit 2 parallel schneidenden Scheren zurückgegriffen werden, da zwar die Teilung mit rotierenden Messern sowie die feine Auftrennung mit dem Gewebekomogenisator eine Trennung in etwa gleich große Partikel und damit gleichmäßigen Enzymkontakt erlaubte, jedoch gleichzeitig zu traumatisierend wirkte.

Es muß ein Optimum der mechanischen Zerkleinerung und der enzymatischen Andauung gefunden werden. Dieses Optimum wurde rein empirisch ermittelt mit einer 3-minütigen Zerkleinerung und einer Kollagenasebehandlung über 20 Minuten (43). Bei unseren Versuchen erwies sich eine Inkubationszeit über 15 Minuten als optimal. Die Inkubationszeit ist jedoch unter anderem auch abhängig von der Qualität der verwendeten Kollagenase. Durch Aktivitätsbestimmungen konnten wir weitgehende Unterschiede verschiedener Serien feststellen.

Das verwendete Filtersystem bot einen wesentlichen Vorteil auch in der einfachen Handhabung, selbst wenn die Einrichtung des zerlegbaren Systems noch zu verbessern und evtl. durch ein geschlossenes System zu ersetzen ist. Die insgesamt notwendige Zeit zur Isolierung der Inseln war bei unseren Versuchen mit etwa 60 Minuten sehr günstig. Finch (22) betrachtet eine Isolationszeit von 90 Minuten als kritischen Wert für die Überlebenszeit der Inseln. Lorenz (58) gibt eine Isolationszeit nach Pankreasentfernung unter Verwendung der Fikoll-Gradiententechnik von 2 Stunden an. Wolff (127) benötigt für die Isolierung 90 Minuten.

Die Wahl der Porengröße unseres Filtersystems erlaubte nach unseren histologischen Aufarbeitungen eine Ausbeute an Inseln von 16 - 28 % der insgesamt im Pankreas vorhandenen Inseln. Dabei wurde histologisch eine Verunreinigung mit exokrinen Anteilen von 70 - 85 % festgestellt. Im Vergleich mit anderen Trennmethoden muß diese Effektivität der Isolierung als sehr günstig angesehen werden, und der Grad der Verunreinigung kann nach Untersuchungen von Gerasch (24) für die intraportale Transplantation toleriert werden. 10 % der normalerweise im Pankreas vorhandenen Inseln sollen zur Erzielung einer Normoglykämie ausreichen (22). Entsprechend wurde auch festgestellt, daß nach Resektion von 90 - 95 % des Pankreasorgans unter Umständen kein Diabetes auftritt. Kretschmer (44) konnte bei einer Inselausbeute von 8 % mit Transplantaten in die Milz Normoglykämie erreichen.

3. Transplantationsort

Fast sämtliche Gewebe wurden als Implantationsorte für die isolierten Inseln ausgetestet, und es erwies sich die Transplantation über die V. portae in die Leber als geeignete Methode. Bei grober Trennung führt die Menge des zu transplantierenden Gewebes zu Pfortaderhochdruck, so daß dann die Transplantation in die Milz nach tierexperimentellen Erfahrungen günstiger ist (43, 113). Kolb (39) führte Autotransplantationen bei pankreat-ektomierten Hunden in die Leber und in die Milz durch und konnte praktisch keine Unterschiede feststellen. Mirkovitch (74) und Kretschmer (42) erachten nach Experimenten mit Hunden die Milz als geeigneten Transplantationsort für Pankreasfragmente. Intraportal transplantierte Pankreasfragmente bewirken eine portale Hypertension (64).

Bereits 1972 konnte Ballinger (3) die Funktion von intraperitoneal oder intramuskulär transplantierten isolierten Inseln bei Ratten nachweisen. Matas (68) wies bei Mäusen nach, daß die intraportale der intravenösen leicht und der intraperitonealen Transplantation deutlich überlegen ist. Amamoo (1) fand bei Ratten keinen Anstieg des Pfortaderdruckes und keine Leberfunktionsstörungen. Brown (12) konnte die Bedeutung der Leberpassage für das Insulin nachweisen, indem er bei Ratten Pankreasgewebe unter die Nierenkapsel implantierte. Die Stoffwechselfunktionen normalisierten sich dann erst nach Anlage eines Porto-renalen Shunts.

Auch Federlin (17) testete mehrere Organe als Implantationsort und verwendete eine intraperitoneal gelagerte Milliporekammer. Nach seinen Ergebnissen wird die intravaskuläre Transplantation für günstiger gehalten.

Da das Inselgewebe unmittelbar nach der Transplantation an eine Ernährung durch Diffusion angewiesen ist, erscheinen die relativ bescheidenen Ergebnisse nach Implantation in ein Gewebsareal mit behinderter Zirkulation (Subcutis, Muskulatur) verständlich. Die Diffusion bis zur Neovaskularisation ist eigentlich nur bei intravasaler Transplantation gewährleistet.

Die ausreichende Trennung schien bei unseren Versuchen für eine intraportale Transplantation geeignet. Das Vorschieben eines dünnen Venenkatheters über einen Mesenterialvenenast ließ sich einfach durchführen und erlaubt bei Röntgenkontrolle auch die Transplantation gezielt in einen Leberlappen. Intra- und postoperative Komplikationen infolge der Transplantation beobachteten wir nicht.

Der Pfortaderdruck stieg nach der Transplantation im Mittel auf 13,2 cm H₂O an, war jedoch in den meisten Fällen bei Versuchsabschluß wieder im Normbereich. Auch durch Portographie konnten keine Obstruktionen größerer Pfortaderäste nachgewiesen werden. Nach den histologischen Befunden wären infolge Thrombosierung und Organisation solche Veränderungen zu befürchten. Jedoch ergab sich in Übereinstimmung mit anderen Untersuchern bei ausreichender Trennung keine portale Hypertension.

Die Bestimmung der Leberenzyme ergab lediglich eine geringe Erhöhung der SGPT bis zum 14. postoperativen Tag, womit wesentliche Leberfunktionsstörungen nicht nachgewiesen werden konnten. Histologisch fanden sich Leberveränderungen nur im Sinne einer Leberverfettung und Amyloideinlagerung, wie sie auf grund exokriner Insuffizienz auch bei Kontrolltieren ohne Transplantation gefunden wurden.

4. Funktion nach Autotransplantation

Von 14 Tieren mit Inselautotransplantaten war postoperativ bei 6 Hunden eine Normoglykämie festzustellen. Insgesamt waren die Blutzuckerspiegel gegenüber den Kontrolltieren bereits am ersten postoperativen Tag signifikant erniedrigt. Mosimann (77) hält zunächst eine Hyperglykämie über mehrere Tage für die Funktionsaufnahme transplanterter Inseln für erforderlich. Unsere Ergebnisse können nicht bestätigen, daß bei anfänglicher Hyperglykämie im weiteren Verlauf bessere Resultate erzielt werden.

Nach mehrwöchiger Versuchsdauer mußten wir insgesamt wieder Anstiege der Nüchternblutzuckerspiegel feststellen, was auf einen Funktionsverlust der transplantierten Inseln schließen läßt. Ein Hinweis hierauf wird von anderen Untersuchern nicht mitgeteilt. Lediglich bei einer klinischen Autotransplantation wurde 12 Monate nach der Transplantation ein Anstieg des Insulinbedarfs beschrieben (127).

Die Bestimmung der Insulinspiegel nach Autotransplantation zeigt zwar eine signifikante Erhöhung gegenüber den Kontrolltieren, jedoch sind die Spiegel gegenüber normalen Tieren deutlich erniedrigt, wahrscheinlich bedingt durch die insgesamt doch deutlich verminderte Anzahl funktionstüchtiger Inseln oder durch eine herabgesetzte Sekretionsleistung der transplantierten Inseln.

Die bei einem Tier nach 4 Wochen gemessenen extrem hohen Insulinwerte sind schwer zu interpretieren, zumal auch hiermit keine blutzuckersenkende Funktion verbunden war. Es läßt sich vermuten, daß eine insulinähnliche Substanz in die Messung eingeht, die jedoch keine Insulinwirkung besitzt. Ein histologisches Korrelat hierzu, etwa in Form eines Adenoms, wurde nicht gefunden.

Sowohl der Glukosebelastungstest als auch der Tolbutamidtest zeigen nach Autotransplantation deutlich pathologische Reaktionen. Nach steilem Blutzuckeranstieg kommt es nur sehr verzögert wieder zu einer Blutzuckersenkung. Diese Reaktionen weisen auf eine verminderte Sekretionsleistung und auf eine Sekretionsstarre der transplantierten Inseln. Henriksson (32) fand nach intra-portaler Transplantation bei Ratten eine Normoglykämie, jedoch ebenfalls abnormale Glukosetoleranzteste. Bei Affen konnte Jonasson (34) nach intraportaler Transplantation C-Peptid und Insulin nachweisen. Bei der Glukosebelastung kam es jedoch zu keinem Insulinstieg. Kolb (39) und Mirkovitch (74) erreichten bei Autotransplantationen in Leber und Milz pankreatektomierter Hunde Erfolge, fanden jedoch auch eine verminderte Glukosetoleranz. Kretschmer (43) erreichte dagegen bei Autotransplantationen von Pankreasfragmenten in Leber und Milz eine weitgehende Normalisierung der Glukosetoleranz.

In vitro konnte eine gestörte Insulinsekretion nach Kollagenaseisolierung festgestellt werden (29). Hahn zeigte eine erhöhte basale Insulinsekretion und eine deutlich verminderte und verzögerte Insulinabgabe nach Glukosestimulation. Eine Rolle bezüglich Funktionseinbuße isolierter Inseln könnte auch der Verlust nervaler Verbindungen spielen. Weiss (126) fand nach Zerstörung hypothalamischer Formationen eine signifikante Verminderung der B-Zellanteile.

Die histologische Aufarbeitung der Leber bei Versuchsabschluß gibt einige wichtige Hinweise für die nachlassende Funktion der Transplantate. Durch die Transplantation in die Pfortader mit embolisierender Wirkung der kleinen Lebervenen kommt es an den transplantierten Geweben zur Anlagerung von Thromben.

Infolge Membranschädigung des isolierten Materials wird Gewebsthromboplastin frei und es kommt zur Prothrombinaktivierung. Zusätzlich wird durch Kontakt des Blutes mit Kollagenfibrillen und Basalmembranen eine Gerinnungsaktivierung herbeigeführt. Die nachfolgende Organisation führt durch Makrophagen zu Resorptionsvorgängen, zu bindgewebigem Umbau und schließlich Verlust an nachweisbaren transplantierten Inselzellen. Organisation und Fibrosierung konnten wir histologisch gut dokumentieren. Diese Reaktionen werden von anderen Autoren nicht beschrieben, jedoch vermerkt Bretzel (10), daß bei seinen Ratten nach längerer Versuchsdauer die Transplantate in der Leber nicht mehr nachweisbar waren.

Mehigan (71) berichtet über eine wichtige Erscheinung mit Hinweis auf intravasale Thrombosierung infolge der Transplantation. Bei klinischer Autotransplantation kam es zu einem Anstieg des Pfortaderdruckes auf 49 cm H₂O durch eine akute disseminierte intravasale Koagulation mit massiver Blutung, die wahrscheinlich durch Gewebethromboplastin hervorgerufen wurde. Aufgrund daraufhin veranlaßter tierexperimenteller Untersuchungen wird eine Hinzufügung von Heparin und Aprotinin zum Transplantat empfohlen. Diese Ergebnisse lagen bei Durchführung unserer Versuche noch nicht vor, so daß wir diese Empfehlung noch nicht berücksichtigen konnten. Die Verhinderung thrombotischer Auflagerung scheint uns auch für die Erhaltung der transplantierten Inseln von Bedeutung.

5. Funktion nach Allotransplantation

Nach Inselallotransplantation ergaben sich vom 1. bis zum 7. postoperativen Tag gegenüber den Kontrolltieren signifikant erniedrigte Blutzuckerspiegel und vom 1. bis zum 5. postoperativen Tag signifikant erhöhte Insulinspiegel. Eine Normoglykämie wurde nur bei 2 von 8 Tieren bis zum 7. bzw. 13. postoperativen Tag erreicht. Beim Glukosebelastungstest zeigten sich wie nach Autotransplantation pathologische Reaktionen mit steilem Anstieg und verzögertem Abfall der Blutzuckerspiegel ohne wesentlichen Anstieg der Insulinspiegel.

Lorenz (58) konnte nach Allotransplantation unter Verwendung der Fikoll-Gradiententechnik eine Funktion über 3 - 4 Wochen mit Insulinanstieg bei der Glukosebelastung nachweisen. Younoszai (128) hält transplantierte Inseln für mehr effektiv unter Fastenbedingungen ohne exzessive Glukosebelastung. Melken (87) erreichte durch intraportale Allotransplantate bei Ratten eine Normoglykämie für 1 - 4 Tage, die er durch Immunsuppressiva auf 13 bis 68 Tage verlängern konnte.

Die histologisch nachgewiesenen lymphozytären Infiltrate und Resorptionsvorgänge mit kaum noch nachweisbaren Inselzellen nach einer Versuchsdauer von 17 bis 77 Tagen zeigen die heftige Abwehrreaktion auf Fremdgewebe. Slater (109) wies ab dem 2. Tag nach Inselallotransplantation mononukleäre Infiltrate nach und konnte nach 14 Tagen nur noch spärlich Reste von B-Zellen erkennen. Makrophagen sind wesentlich beteiligt und phagozytieren fremde Zellen. Durch unspezifische Bindung der Makrophagen infolge Injektion von Silikaten konnte Nash (86) die Funktion transplanterter Inseln verlängern.

Es wird allgemein angenommen, daß freie Transplantate von allogen transplantierten Inseln immunologisch wirksamer sind oder gegen Abstoßungsmechanismen empfindlicher reagieren (113). Durch Heparin oder Ascorbinsäure konnte Kolb (40) keine Verbesserung der Resultate erreichen. Die Aktivierung der Gewebemakrophagen scheint problematisch und mit Mitteln normaler Immunsuppression schwer zu hemmen. Finch (22) konnte bei Ratten die Normoglykämie durch Erhöhung der Anzahl transplanzierter Inseln verlängern. Entsprechend konnte Rumpf (99) durch eine 2. und 3. Transplantation die Ergebnisse verbessern. Casanova (13) erreichte durch Vorbestrahlung der Milz als Transplantationsort und zusätzlicher Immunsuppression eine Funktionsverlängerung lediglich auf 6,5 - 8,5 Tage. Bitter-Suermann (6) konnte die Funktionsdauer von Pankreassegmenten bei Ratten durch simultane Milztransplantation erhöhen. Zastrow (129) sieht den Nachteil der in die Milz transplantierten groben Pankreasfragmente in größerer Immunogenität des mittransplantierten exokrinen und lymphatischen Gewebes.

Insgesamt konnte durch unsere Versuche mit Allotransplantaten von isolierten Inseln bestätigt werden, daß im Vergleich zu den experimentellen Erfahrungen mit Pankreassegmenttransplantationen relativ frühzeitig ein Funktionsverlust durch Immunreaktion eintritt. In Einzelfällen war eine Funktion der Transplantate mit Insulinsekretion auch über die 2. postoperative Woche hinaus nachweisbar. Möglicherweise spielt hier die Anzahl der transplantierten Inseln eine Rolle. Wie bei der Autotransplantation hat auch hier sicher die Anlagerung thrombotischer Materials an die Transplantate eine Bedeutung, so daß durch deren Verhütung sich eine Funktionsverlängerung erzielen lassen könnte. Betrachtet man die bisherigen experimentellen Erfolge zur Immunsuppression allogener Inseltransplantate, muß nach weiteren geeigneten Konzepten gesucht werden.

VIII. Schlußfolgerungen

1. Der duodeno-pankreatektomierte und pankreatektomierte Hund dient in gleichem Maße als zuverlässiges Diabetesmodell. Gegenüber dem Alloxan- oder Streptozotocin-induzierten Diabetes müssen jedoch die Nachteile der exokrinen Pankreasinsuffizienz in Betracht gezogen werden.
2. Mit Hilfe des beschriebenen Filtersystems und der bekannten Kollagenasedigestion konnte die Effektivität der Isolierung bei tolerabler Verunreinigung mit exokrinem Gewebe auf 16 - 28 % gesteigert werden.
3. Nach intraportaler Inselautotransplantation kommt es zu anhaltender Senkung der Blutzuckerspiegel gegenüber den diabetischen Kontrolltieren bis zur Normoglykämie. Es läßt sich eine Insulinsekretion nachweisen, die jedoch gegenüber normalen Insulinspiegeln deutlich erniedrigt ist. Beim Glukosetoleranztest zeigt sich ein deutlich pathologischer Verlauf im Sinne einer Sekretionsstarre. Nach Ablauf mehrerer Wochen läßt sich eine langsam zunehmende Funktionseinbuße feststellen. Als Substrat ließen sich histologisch Anlagerungen thrombotischen Materials an die Transplantate mit nachfolgenden Organisationsvorgängen nachweisen.
4. Nach intraportaler Inselallotransplantation ohne Immunsuppression läßt sich nur relativ kurzfristig eine blutzuckersenkende Wirkung mit Insulinsekretion nachweisen. Die histologische Untersuchung der Leber bei Versuchsabschluß zeigt jeweils dichte lymphozytäre Infiltrate und Makrophagen. Bereits 2 Wochen nach der Transplantation sind infolge der Resorptionsvorgänge kaum noch Inselzellen nachweisbar.

Ein angestrebtes Ziel, die Inselausbeute bei dem verwendeten Isolierungsverfahren zu verbessern, konnte sicher erreicht werden. Der Einsatz des entwickelten Filtersystems erwies sich als praktikabel und effektiv.

Wesentlich für die intraportal transplantierten Inseln scheint die Anlagerung von thrombotischem Material an die Transplantate mit nachfolgender Organisation zu sein. Zunächst gut funktionierende autotransplantierte Inseln werden im Verlaufe mehrerer Wochen narbig umgebaut. Eine direkte Folge aus diesen Erkenntnissen sind weitere Versuche mit gleichzeitiger Vermeidung der intravaskulären Thrombosierung z.B. durch Heparinisierung der Tiere vor Transplantation.

IX. Zusammenfassung

Klinische Pankreasorgantransplantationen wurden bis heute bei einer Reihe von diabetischen Patienten mit Nephropathie und erforderlicher Nierentransplantation durchgeführt, da nur die kontinuierliche Blutzuckerregulation durch das Inselgewebe Schäden auch an der übertragenen Niere verhindert, und da eine Immunsuppression bei diesen Patienten ohnehin erforderlich ist. Die Pankreasorgantransplantation ist jedoch mit erheblichen Komplikationen belastet, die zum größten Teil auf das transplantierte exokrine Gewebe zurückzuführen sind.

Seit einigen Jahren wird von vielen Arbeitsgruppen versucht, das Inselgewebe aus dem exokrinen Verband zu lösen und die isolierten Inseln in verschiedene Gewebe zu implantieren. Ein bevorzugter Transplantationsweg ist dabei die Infusion der Gewebepartikel über die Pfortader in die Leber des Empfängers. Bei erforderlicher Duodeno-Pankreatektomie wegen chronischer Pankreatitis wurde dieses Verfahren auch zur Autotransplantation angewendet. Die Ergebnisse sind zum größten Teil noch unbefriedigend. Der Hauptmangel des Verfahrens ist die zu geringe Ausbeute an Inseln bei den bis jetzt verfügbaren Isolationsmethoden. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines geeigneten Isolationsverfahrens, um eine höhere Rate an Inseln für die Transplantation zu gewinnen.

Mit Hilfe Kollagenasedigestion und Filtrierung von Pankreasfragmenten konnte die Ausbeute an isolierten Inseln auf 16 - 28 % gesteigert werden. Dabei wurde eine Verunreinigung mit exokrinen Gewebsanteilen von 70 - 85 % gesehen. Dieser exokrine Anteil ist für die intraportale Transplantation in die Leber tolerabel.

Bei 14 pankreatektomierten Hunden wurde eine Insel-autotransplantation über die Pfortader in die Leber vorgenommen. Durch die Transplantation hervorgerufene Komplikationen wurden nicht beobachtet. Bei den meisten Tieren

zeigte sich gegenüber den Kontrolltieren sofort ein blutzuckersenkender Effekt. Bei 6 Tieren bestand über mehrere Wochen eine Normoglykämie, jedoch zeigte auch bei diesen Tieren der Glukosetoleranztest einen pathologischen Verlauf mit deutlich verzögertem Blutzuckerabfall. Die Insulinspiegel waren gegenüber gesunden Tieren deutlich erniedrigt, im Vergleich zu den nur pankreatektomierten Kontrolltieren zeigte sich jedoch eine signifikante Erhöhung. Im Verlauf mehrerer Wochen war dann ein Funktionsabfall der transplantierten Inseln festzustellen. Die bei Versuchsabschluß durchgeführte Leberhistologie zeigte in frühen Stadien die Inseln in Lebervenen mit angelagerten thrombotischen Materialien. Mit zunehmender Versuchsdauer ließen sich dann typische Organisationsvorgänge nicht nur der Thromben sondern auch der Inseln bis zum narbigen Umbau nachweisen.

Bei 8 pankreatektomierten Hunden erfolgte die Allogtransplantation in die Leber. Bei 2 Tieren wurde für 7 bzw. 13 Tage eine Normoglykämie erreicht. Die Insulinspiegel waren gegenüber der Kontrollgruppe nur pankreatektomierter Hunde lediglich vom 1. bis zum 5. postoperativen Tag signifikant erhöht. Histologisch zeigten die Portalfelder massive lymphozytäre Infiltrate als deutliche Zeichen der Abwehrreaktion. Nach über 2 Wochen Versuchsdauer waren nur noch Inselreste mit kollagener Faserbildung zu erkennen.

Durch die Versuche konnte gezeigt werden, daß mit Hilfe der Filtertrennung eine gute Ausbeute an isolierten Inseln zu erzielen ist. Als wichtige Problematik erscheint die Anlagerung von Thromben innerhalb des portalen Gefäßsystems mit nachfolgender Organisation und Funktionseinbuße. Die kurzfristige Abstoßung von allotransplantierten Inseln wurde bestätigt. Über eine Beeinflussung der Gerinnung bei Transplantation und Einsatz verschiedener Immunsuppressiva muß in weiteren Experimenten versucht werden, die Funktion der Transplantate weiter zu verbessern und die Funktion langfristig zu erhalten.

X. Literaturverzeichnis

1. Amamoo D.G., J.E. Woods, K.E. Holley: Effect of intra-hepatically implanted islets of Langerhans on hepatic function in the rat.
Mayo Clinic Proc. 50, 416 (1975)
2. Andersson A., J. Berg, C.G. Groth, R. Gunnarsson, C. Hellerstrom, G. Lundgreen, J. Westman, J. Ostman: Survival of isolated human islets of Langerhans maintained in tissue culture.
J. Clin. Invest. 57, 1295 (1976)
3. Ballinger W.F., P.E. Lacy: Transplantation of intact pancreatic islets in rats.
Surgery 72, 175 (1972)
4. Bergan J.J., J.G. Hoehn, N. Poreter, L. Dry: Total pancreatic allografts in pancreatectomized dogs.
Arch. Surg. 90, 521 (1965)
5. Beyer M.M., E.A. Friedman: Histocompatibility-dependent long-term islets of Langerhans survival induced by antilymphocyte globulin.
Transplant. Proc. 11, 1436 (1979)
6. Bitter-Suermann H., J. Säve-Söderbergh: The course of pancreas allografts in rats conditioned by spleen allografts.
Transplantation 26, 28 (1978)
7. Boenig H.: Leitfaden der Entwicklungsgeschichte des Menschen. 10. Auflage von R. Bertolini
Verlag Georg Thieme, Leipzig, 1971
8. Bornemisza G., I. Furka, B. Szentkereszy, I. Miko, P. Demény: Experimentelle Pankreastransplantation am Schwein.
Z. Exper. Chir. 11, 139 (1978)
9. Bowen K.E., L. Andrus, K.J. Lafferty: Successful allotransplantation of mouse pancreatic islets to nonimmunosuppressed recipients.
Diabetes 29, Suppl. 1, 98 (1980)
10. Bretzel R.G., E. Manns, C. Schomber, K. Federlin: Die Leber als Implantationsort für Langerhanssche Inseln beim experimentellen Diabetes.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 84, 1213 (1978)
11. Brown J., W.R. Clark, R.K. Markoff, H. Weisman, J.A. Kemp, Y. Mullen: Pancreas transplantation for diabetes mellitus.
Ann. Int. Med. 89, 951 (1978)
12. Brown J., Y. Mullen, J.G. Molnar, W.R. Clark: Importance of hepatic-portal route for control of diabetes.
Diabetes 25, Suppl. 1, 338 (1976)

13. Casanova M., E. Kolb, A. Vollenweider, F. Largiadèr, H.G. Aberle: Verzögerung der Frühabstoßung von intra-lienalen Pankreas-Allotransplantaten durch fraktionierte Milzbestrahlung beim Hund.
Chir. Forum Exp. Klin. Forsch. 80, 135 (1980)
14. Chick W.L., J.J. Perna, V. Lauris, D. Low: Artificial pancreas using living Beta cells: Effects on glucose homeostasis in diabetic rats.
Science 97, 780 (1977)
15. Dobroschke J., K. Schwemmler, G. Langhoff, H. Laube, R.G. Bretzel, K. Federlin: Autotransplantation von Langerhansschen Inseln nach totaler Duodenopankreatektomie bei einem Patienten mit chronischer Pankreatitis.
Dtsch. Med. Wschr. 103, 1905 (1978)
16. Dubernard J.M., J. Traeger, P. Neyra, J.L. Touraine, D. Tranchant, N. Blanc-Brunat: A new method of preparation of segmental pancreatic grafts for transplantation - trials in dogs and in man.
Surgery 84, 633 (1978)
17. Federlin K., M. Slijepčević, K. Helmke: Islet transplantation in experimental diabetes of the rat.
Horm. Metab. Res. 8, 97 (1976)
18. Federlin K., R. Bretzel, K. Helmke: Inselzelltransplantation - eine Chance für die Behandlung des Diabetes mellitus?
Med. Welt 29, 538 (1978)
19. Ferguson J., R.H. Allsopp, M.R. Taylor, I.D. Johnston: Isolation of viable human pancreatic islets.
World J. Surg. 1, 69 (1977)
20. Ferner H.: Das Inselsystem des Pankreas.
Verlag Georg Thieme, Stuttgart (1951)
21. Finch D.R.A., P.H. Wise, P.J. Morris: The effect of increasing islet numbers on survival of pancreatic islet allografts in immunosuppressed diabetic rats.
Transplantation 23, 104 (1977)
22. Finch D.R.A., P.H. Wise, P.J. Morris: Successful intrasplenic transplantation of syngeneic and allogeneic isolated pancreatic islets.
Diabetologia 13, 195 (1977)
23. Garvey J.F.W., P.J. Morris, P.R. Millard: Early rejection of allogeneic foetal rat pancreas.
Transplantation 27, 342 (1979)
24. Gerasch U., K.D. Rumpf: Der Einfluß exokrinen Drüsengewebes auf den Transplantationserfolg isolierter Inseln.
Chir. Forum Exp. Klin. Forsch. 79, 353 (1979)

25. Gliedmann M.L., M. Gold, J. Wittaker H. Rifkin, R. Sobermann, I. Field, V. Tellis, F.J. Veith: Pancreatic duct to ureter anastomosis for exocrine drainage in pancreatic transplantation.
Amer. J. Surg. 125, 245 (1973)
26. Goetz F.C.: Evaluating the benefits of human islet transplantation.
Diabetes 29, Supl. 1, 52 (1980)
27. Gray B.N.: Transplantation of the pancreas. Its present status and future application.
Aust. N. Z. J. Surg. 47, 143 (1977)
28. Groth C.G., G. Lundgreen, R. Gunnarsson, P. Arner, B. Berg, J. Östman: Segmental pancreatic transplantation with duct ligation or drainage to a jejunal Roux-en-Y loop in nonuremic diabetic patients.
Diabetes 29, Supl. 1, 3 (1980)
29. Hahn H.J., R. Galabowa, R. Butter, M. Ziegler, K.D. Kohnert, P. Petkov: Untersuchungen zum Einfluß der Kollagenase auf das endokrine Pankreas in vitro.
Ergeb. Exp. Med. 26, 39 (1977)
30. Hegre O.D., R.J. Leonard, J.D. Rusin, A. Lazarow: Transplantation of the fetal rat pancreas: quantitative morphological analysis of islet tissue growth.
Anat. Res. 185, 209 (1976)
31. Hellerström C.: A method for the microdissection of intact pancreatic islets of mammals.
Acta Endocrinol. (Kbh.) 45, 122 (1964)
32. Henriksson Ch., J. Bergmark, G. Claes: Metabolic response of small numbers of isolated islets of Langerhans in rats.
Eur. Surg. Res. 9, 411 (1977)
33. Howard R.J., J. Matas, H.H. Balfour, R. Cohn, J.S. Najarian, D.E.R. Sutherland: Reversal of encephalomyocarditis virusinduced diabetes mellitus by islet transplantation.
Transplant. Proc. 11, 557 (1979)
34. Jonasson O., W.A. Reynolds, G. Snyder, G. Hovesten: Experimental and clinical therapy of diabetes by transplantation.
Transplant. Proc. 9, 223 (1977)
35. Jonasson O.: Transplantation of the pancreas 1978.
Transplant. Proc. 11, 325 (1979)
36. Kelly W.D., Lillehei R.C., F.K. Merkel, Y. Idezuki, F.C. Goetz: Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy.
Surgery 61, 827 (1967)

37. Kemp C.B.: Effect of transplantation site on results of pancreatic islet isografts in diabetic rats.
Diabetologia 9, 486 (1973)
38. Kemp J.A., Y. Mullen, H. Weissman, D. Heininger, J. Brown, W.R. Clark: Reversal of diabetes in rats using fetal pancreases stored at -196°C .
Transplant. 26, 260 (1978)
39. Kolb E., R. Ruckert, F. Largiadèr: Intraportal and intrasplenic autotransplantation of pancreatic islets in the dog.
Eur. Surg. Res. 9, 419 (1977)
40. Kolb E., F. Largiadèr: Frühabstoßung von intraportalen und intralientalen Pankreas-Allotransplantaten.
Chir. Forum Exp. Klin. Forsch. 79, 359 (1979)
41. Kösters W.: Rückbildung diabetischer Glomerulusveränderungen nach Inselzell-Transplantation.
Fortschr. Med. 97, 825 (1979)
42. Kretschmer G.J., D.E.R. Sutherland, A.J. Matas, T.L. Cain, J.S. Najarian: Autotransplantation of pancreatic islets without separation of exocrine and endocrine tissue in totally pancreatectomized dogs.
Surgery 82, 74 (1977)
43. Kretschmer G.J., D.E.R. Sutherland, A.J. Matas, W.D. Payne, J.S. Najarian: Autotransplantation of pancreatic fragments to the portal vein and spleen of totally pancreatectomized dogs.
Ann. Surg. 187, 79 (1978)
44. Kretschmer G.J.: Autotransplantation von Pankreasfragmenten: Untersuchungen am Diabetesmodell total pankreatektomierter Hunde.
Wien. Klin. Wschr. (Suppl.) 90, 3 (1978)
45. Kretschmer G.J., D.E.R. Sutherland, A.J. Matas, J.S. Najarian: Preliminary experience with allotransplantation of pancreatic fragments to the spleen of totally pancreatectomized dogs.
Transplant. Proc. 11, 537 (1979)
46. Kühl C., St.L. Jensen, O.V. Nielsen: Porcine gastric insulin.
Endocrinology 99, 1667 (1976)
47. Lacy P.E., Kostianovsky M.: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16, 35 (1967)
48. Lacy P.E., J.M. Davie, E.H. Finke: Effect of culture on islet rejection.
Diabetes 29, Suppl. 1, 93 (1980)

49. Land W., H. v.Liebe, H. Höpp, D. Jochan, E. Schmitz, U. Jensen, G. Hillebrand, H. Kuhlmann, K. Eberhard, H. Weitz: Simultantransplantation von Pankreas und Niere - Verwendung eines neuen Pankreasokklusionsgels. Chir. Praxis 27, 15 (1980)
50. Largiadèr F.: Modifizierte Technik der isotopen Pankreas-transplantation. Z. Ges. Exp. Med. 143, 261 (1967)
51. Largiadèr F., H. Rosenmund, H. Jakob: Das Verhalten der Serumamylase bei normalen, pankreatektomierten und pankreas-transplantierten Hunden. Schweiz. Med. Wschr. 98, 323 (1968)
52. Largiadèr F.: Farewell to pancreatic organ transplantation? Eur. Surg. Res. 9, 399 (1977)
53. Largiadèr F., E. Kolb, U. Binswanger, R. Illig: Erfolgreiche Pankreasinsel-Allotransplantation. Schweiz. Med. Wschr. 109, 1733 (1979)
54. Leonard J., Perloff M., A. Naji, W.K. Silvers, T.J. Mc Kearn, C.F. Barker: Vascularized pancreas versus isolated islet allografts: An immunological comparison. Surgery 88, 222 (1980)
55. Lillehei R.C., J.O. Ruiz, C. Acquino, F.C. Goetz: Transplantation of the pancreas. Acta Endocrinol. 83, Suppl. 205, 303 (1976)
56. Lindall A., M. Steffes, R. Sorenson: Immunoassayable insulin content of subcellular fractions of rat islets. Endocrinol. 85, 218 (1969)
57. Lorenz D., R. Reding, J. Petermann, R. Bechert, V. Worm, W. Tietz, K.D. Rosenbaum, H. Lippert, A. Dorn, G. Koch: Transplantation isolierter Langerhansscher Inseln in die Leber diabetischer Hunde. Zbl. Chir. 101, 1359 (1976)
58. Lorenz D., H. Lippert, W. Tietz, V. Worm, H.J. Hahn, A. Dorn, G. Koch, M. Ziegler, K.D. Rosenbaum: Transplantation of isolated islets of Langerhans in diabetic dogs. J. Surg. Res. 27, 181 (1979)
59. Lorenz D., H. Lippert, E. Panzig, H. Köhler, G. Koch, W. Tietz, H.J. Hahn, A. Dorn, V. Worm, M. Ziegler: Transplantation of isolated islets of Langerhans in diabetic dogs. III. Donor selection by mixed lymphocyte reaction and immunosuppressive treatment. J. Surg. Res. 27, 205 (1979)
60. Lorenz D., H. Wolff, H. Lippert, D.E.R. Sutherland, H.J. Hahn: Transplantationsregister für Pankreas und Langerhanssche Inseln. Chirurg 52, 590 (1981)

61. Mandel T.E., L. Higginbotham: Organ culture and transplantation of fetal mouse pancreatic islets. Transplant. Proc. 11, 1505 (1979)
62. Marble A.: Long-term diabetes and the effects of treatment. In: Diabetes, Proc. of 7th congress of the International Diabetes Federation. Edited by R.R. Rodriquez. Excerpta Medica, London (1971)
63. Markowitz J., J. Archibald, H.G. Downie: Experimental surgery. The Wilkins and Wilkins Company (1964)
64. Matas A.J., D.E.R. Sutherland, M.W. Steffes, J.S. Najarian: Short-term culture of adult pancreatic fragments for purification and transplantation of islets of Langerhans. Surgery 80, 183 (1976)
65. Matas A.J., D.E.R. Sutherland, M.W. Steffes: Pancreatic islet transplantation - effects using neonatal rat pancreas. J. Surg. Res. 20, 143 (1976)
66. Matas A.J., D.E.R. Sutherland, M.W. Steffes, J.S. Najarian: Islet transplantation. Surgery 145, 757 (1977)
67. Matas A.J., D.E.R. Sutherland, W.D. Payne: A mouse model of islet transplantation using neonatal donors. Transplantation 24, 389 (1977)
68. Matas A.J., W.D. Payne, J.C. Grotting, D.E.R. Sutherland, M.W. Steffes, B.F. Hertel, J.S. Najarian: Portal versus systemic transplantation of dispersed neonatal pancreas. Transplantation 24, 333 (1977)
69. Mauer S.M., D.E.R. Sutherland, M.W. Steffes: Pancreatic islet transplantation - effects on the glomerular lesions of experimental diabetes in the rat. Diabetes 23, 748 (1974)
70. Mauer S.M., J. Barbosa, R.L. Vernier, C.M. Kjellstrand, T.J. Buselmeier, R.L. Simmons, J.S. Najarian, F.C. Goetz: Development of diabetic vascular lesions in normal kidneys transplanted into patients with diabetes mellitus. New Engl. J. Med. 295, 916 (1976)
71. Mehigan D.G., W.R. Bell, G.D. Zuidema, J.C. Eggleston, J.L. Cameron: Disseminated intravascular coagulation and portal hypertension following pancreatic islet auto-transplantation. Ann. Surg. 191, 287 (1980)
72. Meyer W.: Zur experimentellen Chirurgie der Pankreas-transplantation. Verlag Peter Lang, Eur. Hochschulschr. Bd. 21 (1979)

73. Mirkovitch V., M. Campiche: Successful intrasplenic autotransplantation of pancreatic tissue in totally pancreatectomized dogs.
Transplant. 21, 265 (1976)
74. Mirkovitch V., M. Campiche: Absence of diabetes in dogs after total pancreatectomy and intrasplenic autotransplantation of pancreatic tissue.
Transplant. Proc. 9, 321 (1977)
75. Mirkovitch V., B. Winistörfer, M. Campiche, F. Mosimann, R. Macarone-Palmieri: Total and immediate pancreatectomy as the mandatory requirement for the ulterior function of autotransplanted islets in dogs.
Transplant. Proc. 11, 1502 (1979)
76. Moser R., H.U. Meili, F. Largiadèr: Die Isschämietoleranz des Pankreas.
Z. Ges. Exp. Med. 143, 266 (1967)
77. Mosimann F.: La transplantation des flots de Langerhans bilan et perspectives.
Schweiz. Med. Wschr. 110, 550 (1980)
78. Moskalewski St.: Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig.
Gen. Comp. Endocrinol. 5, 342 (1965)
79. Mullen Y., W.R. Clark, J. Kemp, J.G. Molnar, J. Brown: Reversal of experimental diabetes by fetal rat pancreas.
Transplnt. Proc. 9, 329 (1977)
80. Najarian J.S., D.E.R. Sutherland, M.W. Steffes: Isolation of human islets of Langerhans for transplantation.
Transplant. Proc. 7, Suppl. 1, 611 (1975)
81. Najarian J.S., D.E.R. Sutherland, A.J. Matas, F.C. Goetz: Human islet autotransplantation following pancreatectomy.
Transplant. Proc. 11, 336 (1979)
82. Najarian J.S., D.E.R. Sutherland, A.J. Matas, M.W. Steffes: Human islet transplantation: A preliminary report.
Transplant. Proc. 9, 233 (1977)
83. Naji A., C.F. Barker, W.K. Silvers: Relative vulnerability of isolated pancreatic islets, parathyroid, and skin allografts to cellular and humoral immunity.
Transplant. Proc. 11, 560 (1979)
84. Nakagawara G., G. Yamasaki, S. Kimura, Y. Kojima, I. Miyazaki: Insulin-releasing activity and successful transplantation of pancreatic islets preserved by tissue culture.
Surgery 83, 188 (1978)
85. Nash J.R., P.R. Bell: Effect of macrophage suppression on the survival of islets allografts.
Transplant. Proc. 11, 986 (1979)

86. Nash J.R., N.W. Everson, R.F.M. Wood, P.R. Bell: Effect of silica and carrageenan on the survival of islet allografts.
Transplantation 29, 206 (1980)
87. Nelken D., E.A. Friedman, S.I. Morse, M.M. Beyer: Islet of Langerhans allotransplantation in the rat.
Transplant. Proc. 9, 333 (1977)
88. Ogilvie R.F.: A quantitative estimation of the pancreatic islet tissue.
Q. J. Med. 6, 287 (1937)
89. Offord R.E., P.A. Halban: Isolation of pancreatic islets of Langerhans by filtration on nylon mesh.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 82, 1091 (1978)
90. Özyol M.B., Ch. Herfarth, W. Kerner, E.F. Pfeiffer: Die postoperative Blutzuckerregulation pankreatektomierter Patienten mit Hilfe der 'künstlichen B-Zelle'.
Chirurg 50, 227 (1979)
91. Pickup J.C., H. Keen, G.C. Viberti: Continuous subcutaneous insulin infusion in the treatment of diabetes mellitus.
Diabetes Care 3, 290 (1980)
92. Pichlmayr R., W. Berner: Transplantation von Geweben und Organen.
Münch. Med. Wschr. 123, 644 (1981)
93. Porte D., L. Girardier, J. Seydoux, Y. Kakazawa, J. Posternak: Neural regulation of insulin secretion in the dog.
J. Clin. Invest. 52, 210 (1973)
94. Reckard C.R., F.P. Stuart, J.A. Schulak: Immunologic comparisons of isolated pancreatic islets and whole-organ allografts.
Transplant. Proc. 11, 563 (1979)
95. Reemtsma K., C.J. Weber, F.X. Pi-Sunyer, R. Lerner, M.A. Hardy: Alternatives in pancreatic islet transplantation. Tissue culture studies.
Diabetes 29, Suppl. 1, 45 (1980)
96. Reemtsma K., C.J. Weber, F.X. Pi-Sunyer, R. Lerner, E. Zimmermann, M.A. Hardy: Organ culture studies for pancreatic islet transplantation.
Transplant. Proc. 11, 1002 (1979)
97. Reding R., R. Menzel, W. Nowak, H. Hommel, Ch. Rieger, S. Knospe: Experimentelle Studien zur Duodeno-pankreatektomie beim Hund.
Zbl. Chir. Suppl. (7. Wiss. Chir. Tg.) 93, 189 (1969)
98. Rosenzweig J.L., J. Havrankowa, M.A. Lesniak, M. Brownstein, J. Roth: Insulin is ubiquitous in extrapancreatic tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 572 (1980)

99. Rumpf K.D., D. Löhlein, R. Pichlmayr: Multiple transplantations of islets of Langerhans. *Eur. Surg. Res.* 9, 403 (1977)
100. Rumpf K.D., R. Zick, J. Thiele: Methoden zur Funktionskontrolle transplantiertter Langerhansscher Inseln. *Langenbecks Arch. Chir.* 343, 293 (1977)
101. Scharp D.W., C.B. Kemp, H.J. Knight, W.F. Ballinger, P.E. Lacy: Transplantation of islets of Langerhans in diabetic rhesus monkeys. *Surgery* 77, 100 (1975)
102. Scharp D.W., J.J. Murphy, W.T. Newton, W.F. Ballinger, P.E. Lacy: The use of ficoll in the preparation of viable islets of Langerhans from the rat pancreas. *Transplantation* 16, 686 (1973)
103. Scharp D.W., R.C. Merrell, M.M. Feldmeier, R. Downig, F.W. Ballinger: Pseudo-islet formation and culture from canine isolated pancreatic cells. *In vitro* 15, 216 (1979)
104. Scharp D.W., R. Downing, R.C. Merrell, M. Greider: Isolating the elusive islet. *Diabetes* 29, Suppl. 1, 19 (1980)
105. Schulak J.A., F.P. Stuart, R.C. Reckard: Physiologic aspects of intrasplenic autotransplantation of pancreatic fragments in the dog after 24 hours of cold storage. *J. Surg. Res.* 24, 125 (1978)
106. Schwemmler K.: Indikation zur Duodeno-pankreatektomie. *Dtsch. Med. Wschr.* 103, 1391 (1978)
107. Shibata A., C.W. Ludvigson, S.P. Haber, M.L. Mc Daniel, P.E. Lacy: Standardization of a digestion-filtration method for isolation of pancreatic islets. *Diabetes* 25, 667 (1976)
108. Simenovic C.J., K.M. Bowen, J. Kotlarski, K.J. Lafferty: Modulation of tissue immunogenicity by organ culture. *Transplantation* 30, 174 (1980)
109. Slater D., T. Mangnall, A. Smythe, M. Fox: The rejection of islets of Langerhans following intrahepatic transplantation in the rat. *Acta Endocrinol.* 83, Suppl. 205, 295 (1976)
110. Slijepčević M., K. Helmke, K. Federlin: Islet transplantation in experimental diabetes of the rat. I. Comparative studies: Pancreatectomy - Streptozotocin. *Horm. Metab. Res.* 7, 20 (1975)
111. Sutherland D.E.R., M.W. Steffes, M.W. Bauer, G.E. Mc Manus, B.D. Noe, J.S. Najarian: Isolation of human and porcine islets of Langerhans and islet transplantation in pigs. *J. Surg. Res.* 16, 102 (1974)

112. Sutherland D.E.R., A.J. Matas, J.S. Najarian: Pancreas and islet transplantation.
World J. Surg. 1, 185 (1977)
113. Sutherland D.E.R., F.C. Goetz, J.S. Najarian, A.J. Matas: Intraperitoneal transplantation of immediately vascularized segmental pancreatic grafts without duct ligation.
Transplantation 28, 485 (1979)
114. Sutherland D.E.R., A.J. Matas, J.S. Najarian: Pancreatic islet cell transplantation.
Surg. Clin. North Am. 58, 365 (1978)
115. Sutherland D.E.R., F.C. Goetz, J.S. Najarian: Transplantation of dispersed pancreatic islets tissue in humans.
Diabetes 29, Suppl. 1, 31 (1980)
116. Sutherland D.E.R., F.C. Goetz, J.J. Rynasiewicz, D. Baumgartner, D.C. White, B.A. Elick, J.S. Najarian: Segmental pancreas transplantation from living related and cadaver donors: A clinical experience.
Surgery 90, 159 (1981)
117. Torres L.E., L.W. Traverso, Y.Z. Sohn: Intraoperative hemodynamic changes in patients undergoing mixed-cell intraportal autotransplantation of pancreatic tissue.
Anesthesiol. 53, 427 (1980)
118. Traverso L.W., A.M. Abou-Zam Zam: Activation of pancreatic proteolytic enzymes by commercial collagenases.
Transplantation 25, 226 (1978)
119. Trimble E.R., E.G. Siegel, H.R. Berthoud, E. Renold: Intraportal islet transplantation: Functional assessment in conscious unrestrained rats.
Endocrinol. 106, 791 (1980)
120. Tze W.J., J. Tai, F.C. Wong: In vitro culture - A method of pancreatic islet preservation for transplantation.
Metabolism 29, 1020 (1980)
121. Tze W.J., F.C. Wong, L.M. Chen: Implantable artificial capillary unit for pancreatic islet allograft and xenograft
Diabetologia 16, 247 (1979)
122. Usadel K.H., U. Schwedes, G. Bastert, U. Steinau, I. Klempa, W. Fassbinder, K. Schöffling: Transplantation of human fetal pancreas. Experience in thymusaplastic mice and rats and in diabetic patients.
Diabetes 29, Suppl.1, 74 (1980)
123. Weber C.J., M.A. Hardy, R.L. Lerner, K. Reemtsma: Tissue culture isolation and preservation of human cadaveric pancreatic islets.
Surgery 81, 270 (1977)

124. Weber C.J., F.G. Silva, M.A. Hardy, C.L. Pirani, K. Reemtsma: Effects of islet transplantation on renal function and morphology of short- and long-term diabetic rats.
Transplant. Proc. 11, 549 (1979)
125. Weil R., M. Nozawa, M. Koss, C. Weber, K. Reemtsma, R.M. Mc Intosh: Pancreatic transplantation in diabetic rats: Renal function, morphology, ultrastructure and immunohistology.
Surgery 78, 142 (1975)
126. Weiss I., W. Blech, B. Bierwolf: Untersuchungen am perfundierten Rattenpankreas nach Ausschaltung von Kerngebieten des hinteren Hypothalamus im Langzeitversuch.
Ergebn. Exp. Med. 26, 95 (1977)
127. Wolff H., D. Lorenz, H. Lippert: Der gegenwärtige Stand der Pankreasinsel-Transplantation.
Dtsch. Med. Wschr. 106, 506 (1981)
128. Younoszai R., R.L. Sorenson, A.W. Lindall: Homotransplantation of isolated pancreatic islets.
Diabetes 19, 406 (1970)
129. Zastrow F., B. Buchholz, G. Wittrin, A.E. Lison: Entwicklung und Zukunft der Inselzelltransplantation.
Münch. Med. Wschr. 123, 649 (1981)
130. Ziegler M.M., C.R. Reckard, C.F. Barker: Long-term metabolic and immunological considerations in transplantation of pancreatic islets.
J. Surg. Res. 16, 575 (1974)

Lebenslauf

Priv.-Doz.Dr.med. Wolfgang van der Horst

Am 25. 11. 1944 wurde ich als Sohn des Dr.med. Franz van der Horst und seiner Ehefrau Hella in Waldbröl geboren.

Ab 1951 besuchte ich die Katholische Volksschule in Rölsdorf und wechselte 1956 zum Städtischen Naturwissenschaftlichen Gymnasium Düren, wo ich 1965 das Abitur bestand.

Im Sommersemester 1965 studierte ich in Saarbrücken und im Wintersemester 1965/66 an der Universität Bonn und setzte dann an der Universität Düsseldorf das Medizinstudium fort. In Düsseldorf bestand ich im April 1967 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Juli 1968 die ärztliche Vorprüfung. Ab Sommersemester 1970 war ich an der Medizinischen Fakultät der Technischen Hochschule Aachen immatrikuliert und habe hier im Oktober 1971 die ärztliche Prüfung bestanden.

Von Januar 1972 bis August 1972 war ich am Institut für Medizin der Kernforschungsanlage Jülich (Direktor: Prof. Dr. Feinendegen) als Medizinalassistent tätig. Bis zur Approbation als Arzt am 31. 12. 72 war ich dann an der chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Düren (Chefarzt: Dr. Deiters) beschäftigt. Hiernach blieb ich ein weiteres Jahr als chirurgischer Assistent an dieser Klinik.

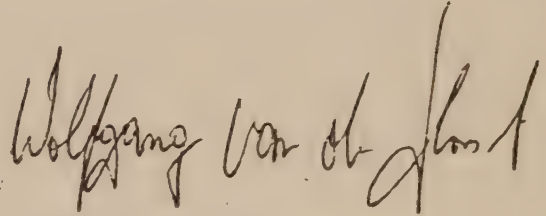
Aus der in Düren geschlossenen Ehe mit meiner Frau Irmgard, geb. Nießen, stammen meine beiden Kinder Tim Rolf und Tina Maria.

Auf Grund meiner experimentellen Arbeiten zum Einfluß von Oestrogen auf Plasmacortisol promovierte ich im Januar 1973 an der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf.

Seit Januar 1974 bin ich als wissenschaftlicher Assistent an der Chirurgischen Universitätsklinik Düsseldorf (Direktor Klinik A: Prof.Dr. K. Kremer, Klinik B: Prof. Dr. W. Bircks) tätig. Die Anerkennung als Arzt für Chirurgie wurde mir im Januar 1979 erteilt.

Seit 1982 bin ich als Oberarzt der Chirurgischen Klinik A unter Prof. Kremer tätig. Neben klinischer Forschung des allgemeinen chirurgischen Fachbereiches habe ich mich experimentell mit Fragen der Transplantation isolierter Pankreasinseln beschäftigt und habe mich über dieses Thema 1982 habilitiert. In meiner Antrittsvorlesung im November 1982 befaßte ich mich mit der Entwicklung der Asepsis in der Chirurgie.

Neben der wirklichen Freude an meiner beruflichen Tätigkeit erwähne ich als wesentlichen Lebensinhalt meinen Familiensinn, Interesse an Musik (insbesondere Klavierspiel) und Literatur sowie sportliche Betätigung wie Tennis und Schwimmen. Die mir gestellten Aufgaben als Dozent einer Universitätsklinik versuche ich mit praktischer Patientenbetreuung und praxisorientierter Forschung und Lehre zu erfüllen.


Dezember 1983

